

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Efecto de la administración de un preparado probiótico sobre
las alteraciones hemodinámicas de pacientes con cirrosis y
ascitis**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Isabel Hernando Alonso

Directores

Diego Rincón Rodríguez

Rafael Bañares Cañizares

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN PREPARADO PROBIÓTICO SOBRE LAS ALTERACIONES HEMODINÁMICAS DE PACIENTES CON CIRROSIS Y ASCITIS

Autor

Ana Isabel Hernando Alonso

Directores

Doctor Diego Rincón Rodríguez

Profesor Rafael Bañares Cañizares

Madrid, 2015

A mis padres, por su valentía, su cariño y su esfuerzo.

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ALT:	Alanina aminotransferasa.
CHC:	Carcinoma hepatocelular.
CHE:	Células hepáticas estrelladas.
CVC:	Catéter venoso central.
DNA:	Ácido desoxirribonucleico.
EHNA:	Esteatohepatitis no alcohólica.
eNOS:	Óxido nítrico sintetasa endotelial.
FC:	Frecuencia cardíaca.
GC:	Gasto cardíaco.
GGT:	Gamma glutamil transpeptidasa.
GPVH:	Gradiente de presión venosa hepática.
HTP:	Hipertensión portal.
IC:	Índice cardíaco.
IL:	Interleucina.
iNOS:	Óxido nítrico sintetasa inducida.
INR:	Índice internacional normalizado.
LBP:	Proteína de unión a lipopolisacáridos.
Lpm:	Latidos por minuto.
MALT:	Tejido linfoide asociado a mucosa intestinal.
MAMP:	Patrones moleculares conservados de los patógenos.
MELD:	Model of End-Stage Liver Disease.
mmHg:	Milímetros de mercurio.
ON:	Óxido nítrico.

PAD:	Presión en la aurícula derecha.
PAM:	Presión arterial media.
PAP:	Presión arteria pulmonar
PCP:	Presión capilar pulmonar.
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PSHE:	Presión suprahepática enclavada.
PSHL:	Presión suprahepática libre.
RMN:	Resonancia magnética nuclear.
RTL:	Receptores toll like.
RVS:	Resistencia vascular sistémica.
SCBI:	Sobrecrecimiento bacteriano intestinal.
SHR:	Síndrome hepatorrenal.
SRE:	Sistema retículoendotelial.
TB:	Traslocación bacteriana.
TC:	Tomografía computarizada.
TNF α :	Factor de necrosis tumoral alfa
UCI:	Unidad de cuidados intensivos.
UFC:	Unidades formadoras de colonias.
VCI:	Vena cava inferior.
VHB:	Virus de la hepatitis B.
VHC:	Virus de la hepatitis C.
VIH:	Virus de la inmunodeficiencia humana.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
- Síndrome de hipertensión portal	7
• Fisiopatología del síndrome de hipertensión portal	7
• Importancia clínica del síndrome de hipertensión portal	16
- Importancia de la traslocación bacteriana en el síndrome de hipertensión portal	20
• Fisiopatología de la traslocación bacteriana en la cirrosis hepática	20
• Diagnóstico de la traslocación bacteriana	24
• Consecuencias clínicas de la traslocación bacteriana	25
• Manipulación farmacológica de la traslocación bacteriana	28
- Utilidad de los preparados probióticos en la cirrosis hepática	30
• Uso de probióticos en enfermedades hepáticas	34
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	40
PACIENTES Y MÉTODOS	42
- Diseño del estudio	43
- Selección de pacientes	43
- Intervención	44
- Metodología de la evaluación	47
• Estudios hemodinámicos	47
• Determinaciones analíticas	49
• Medición de productos derivados del óxido nítrico	49
• Determinación de LBP y citoquinas	49
• Detección de DNA bacteriano	50
- Análisis estadístico	51
RESULTADOS	52
Características de los pacientes	53
Modificación de los parámetros hemodinámicos hepáticos	55
Modificación de los parámetros hemodinámicos sistémicos	56
Modificación de los niveles de sodio sérico	58
Modificación en parámetros de traslocación bacteriana	59
Modificación de parámetros de respuesta inflamatoria sistémica	60
Modificación en los parámetros de función hepática	62
Seguridad de la administración de VSL#3 en pacientes cirróticos con ascitis	62
DISCUSIÓN	63
CONCLUSIONES	80
RESUMEN	82
SUMMARY	90
BIBLIOGRAFÍA	97

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La cirrosis hepática es frecuentemente la consecuencia final del curso prolongado de diferentes enfermedades hepáticas que ocasionan daño parenquimatoso reiterado. En los países occidentales las principales causas de cirrosis son la infección crónica por el virus de la hepatitis C y el consumo crónico excesivo de alcohol. Otras causas frecuentes de enfermedad hepática crónica con evolución hacia cirrosis son la infección crónica por virus de hepatitis B, la hepatitis autoinmune, la cirrosis biliar primaria o la obesidad asociada a esteatohepatitis no alcohólica [1].

La cirrosis es un proceso difuso caracterizado por fibrosis tisular y la sustitución de la arquitectura normal por nódulos estructuralmente anormales [2]. Las características morfológicas claves de la cirrosis incluyen fibrosis difusa y la formación de nódulos de regeneración. La fibrosis se distribuye en forma de septos que conectan diferentes estructuras vasculares del lobulillo hepático, es decir septos porto-portales y septos porto-centrales[3]. Pero el término fibrosis hepática no es sinónimo del término cirrosis, ya que en la cirrosis establecida existe un componente vascular fundamental en la evolución del daño hepático, que es la formación de microfístulas vasculares intrahepáticas entre las diferentes estructuras aferentes (vénula porta y arteriola hepática) y eferentes (vénulas hepáticas) del lobulillo [3, 4]. La formación de estas fístulas viene determinada por la topografía de los septos fibróticos, pues en su mayoría se encuentran insertas en el interior de los mismos [3, 5]. Estos septos fibróticos vascularizados acaban uniendo los tractos portales con las venas centrales, dando lugar a los puentes porto-centrales. El desarrollo de microfístulas vasculares y la vascularización de septos fibrosos son responsables de los cambios en la dinámica sanguínea que se producen en la cirrosis, ya que en la cirrosis avanzada, la mayoría del flujo sanguíneo hepático atraviesa el hígado a través de estas formaciones, lo que significa una disminución significativa del flujo sanguíneo en el resto del parénquima, lo cual establece un círculo vicioso mediante el agravamiento de la lesión hepática [6]. Igualmente el desarrollo de cortocircuitos portosistémicos de gran volumen en la progresión de la cirrosis es

de gran relevancia en la aparición de las principales complicaciones asociadas a la enfermedad.

Otros fenómenos histológicos de la cirrosis son la capilarización de los sinusoides y la fibrosis perisinusoidal, fenómenos de trombosis vascular y desarrollo de lesiones obliterativas en tractos portales, hipoperfusión del parénquima lobular y la consecuente hipoxia tisular [1].

La más grave complicación derivada de la cirrosis instaurada es el desarrollo del síndrome de hipertensión portal.

SÍNDROME DE HIPERTENSIÓN PORTAL

El síndrome de hipertensión portal se desarrolla en la mayoría de los pacientes con cirrosis hepática a lo largo de la evolución de la enfermedad. Se define como el aumento patológico de la presión hidrostática en el sistema venoso portal, lo que ocasiona un gradiente de presión porto-cava por encima de lo normal (1-5 mmHg). El desarrollo de hipertensión portal provoca la aparición de colaterales por donde se deriva parte del flujo portal a la circulación sistémica [7]. Su importancia clínica reside en que es el responsable de las principales complicaciones asociadas a la cirrosis, y que modifican significativamente el pronóstico de la enfermedad: hemorragia digestiva por varices esofágicas / gástricas, desarrollo de descompensación edemoascítica, síndrome hepatorenal o encefalopatía hepática [8].

Fisiopatología del síndrome de hipertensión portal

La presión portal viene determinada por la interrelación entre el flujo sanguíneo portal y la resistencia que se opone a dicho flujo. Según la ley de Ohm, el gradiente de presión entre dos puntos viene definido por la siguiente fórmula: $P_1 - P_2 = Q \times R$.

Si aplicamos esta fórmula al territorio portal, P1-P2 sería el gradiente de presión portal (la diferencia entre la presión en la porta y la presión en la vena cava inferior), Q sería el flujo sanguíneo portal y R correspondería a la resistencia vascular del territorio venoso portal. La resistencia que se opone al flujo sanguíneo portal depende, según la ley de Poiseuille ($R = 8n L/r^4$), de la viscosidad de la sangre (n), la longitud del vaso (L) y el radio del mismo (r). Si tenemos en cuenta que la viscosidad de la sangre (en ausencia de cambios significativos del hematocrito) y la longitud del vaso son variables estables, el factor principal que determina cambios en la resistencia es el radio del vaso, de tal forma que pequeños cambios en el radio condicionan cambios significativos en la resistencia vascular (el valor del radio en la fórmula está elevado a la cuarta potencia) [7].

De estos principios físicos se deduce que los principales mecanismos implicados en el desarrollo de la hipertensión portal son el aumento del flujo sanguíneo portal y de las resistencias vasculares hepáticas.

Cambios en la resistencia vascular intrahepática

En la cirrosis, el aumento de la resistencia vascular se produce a nivel intrahepático, localizado principalmente en los sinusoides hepáticos. El principal factor que interviene en el aumento de la resistencia vascular son los cambios estructurales que se producen (fibrosis, cicatrización y formación de nódulos de regeneración). Estos cambios producen una profunda distorsión en la arquitectura vascular hepática [9]. También se han descrito fenómenos de trombosis vascular a nivel de pequeñas vénulas hepáticas y portales que contribuyen al aumento de la resistencia vascular intrahepática y de la presión portal [10].

Pero, además del factor estructural, existe un componente dinámico y potencialmente modificable que interviene en el aumento de la resistencia vascular hepática. Este componente viene derivado del aumento en el tono vascular intrahepático que se produce en la cirrosis hepática, que contribuye a un aumento de las resistencias vasculares de aproximadamente un 30%, según

los autores que describieron por primera vez este componente funcional en 1985 [11].

El componente dinámico que contribuye al aumento de la resistencia vascular hepática es producido por elementos contráctiles presentes en el hígado, localizados tanto a nivel sinusoidal como extrasinusoidal, que responden frente a factores vasoactivos endógenos o farmacológicos. Uno de los principales elementos contráctiles involucrados en el aumento de las resistencias vasculares son las células hepáticas estrelladas activadas (CHE), localizadas en el espacio de Disse. Estas CHE presentan extensiones citoplasmáticas perisinusoidales con capacidad contráctil, que actúan como verdaderos pericitos tisulares regulando la microcirculación a través de los sinusoides [12]. La capacidad contráctil de las CHE es relevante fundamentalmente en el hígado cirrótico debido a que adquieren un fenotipo activado, con alta capacidad proliferativa, sintética y contráctil, respondiendo con contracción o relajación a diversas sustancias vasoactivas. Estas CHE se localizan también a nivel del septo fibroso, por lo que su contracción podría generar retracción sobre el tejido cicatricial, y con ello la disminución de calibre de vénulas portales y shunt portohepáticos presentes en los septos, contribuyendo al aumento de la resistencia intrahepática [13]. Otros elementos contráctiles hepáticos implicados en el aumento de la resistencia son las vénulas portales (localizadas en el espacio portal), con células musculares lisas que tienen alta capacidad contráctil [14]. Si bien ha sido a las CHE a las que se le ha otorgado hasta ahora el papel fundamental como elementos contráctiles, la importancia de la contractilidad de las vénulas portales sobre la resistencia intrahepática no está todavía aclarada [7, 8].

Los elementos celulares implicados en el aumento de la resistencia vascular intrahepática responden a diferentes sustancias vasoactivas con capacidad vasoconstrictora o vasodilatadora. Estas sustancias vasoactivas pueden ser de origen hepático y actuar de forma paracrina (óxido nítrico, endotelina, prostaciclina, tromboxano, leucotrienos), de origen neural (noradrenalina) o provenir de la circulación sistémica (angiotensina II, vasopresina, noradrenalina circulante). En el hígado cirrótico existe un exceso de sustancias vasoconstrictoras, frente a un déficit en la producción de

sustancias vasodilatadoras. Además, en la cirrosis la respuesta de la microcirculación a las sustancias vasoconstrictoras está aumentada, mientras que la respuesta a las sustancias vasodilatadoras está disminuida [7].

Dentro del marcado desequilibrio entre sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras en el hígado cirrótico, es de especial relevancia el aumento de la resistencia vascular derivado del déficit en la producción de óxido nítrico (ON). En el hígado normal el aumento en el estrés de rozamiento conlleva un aumento en la producción de ON [15], con capacidad vasodilatadora. Esto convierte al hígado en un órgano con una complianza muy elevada, permitiendo que grandes cambios en el flujo hepático ocasionen únicamente mínimos cambios en la presión portal. Sin embargo, en el hígado cirrótico existe una disfunción en el endotelio vascular que condiciona una deficiente producción de ON [16, 17]. Este déficit de ON contribuye al aumento del tono vascular hepático, y por tanto al desarrollo y progresión de la hipertensión portal. Este déficit de ON condiciona también una incapacidad del hígado cirrótico para acomodarse al aumento del flujo esplácnico postprandial; por ello en los pacientes cirróticos existe un brusco aumento de la presión portal tras las comidas [18]. Los mecanismos implicados en el déficit de la producción intrahepática de ON en la cirrosis no están aclarados; si bien parece que la expresión de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) en el hígado cirrótico puede ser normal, es un hallazgo constante la disminución de su actividad [16, 19]. La disminución en la actividad de eNOS en la cirrosis hepática se ha relacionado con una disminución de la fosforilación de eNOS dependiente de Akt [20]. Además, se ha demostrado que la circulación intrahepática en el hígado cirrótico responde inadecuadamente al ON [21], sin que estén aclarados a día de hoy los mecanismos causantes.

Por otra parte, en la cirrosis existe tanto un aumento en la producción de sustancias vasoconstrictoras a nivel intrahepático como un aumento en la concentración circulante de las mismas [22-24]. Además el hígado cirrótico muestra una respuesta aumentada frente a diversos vasoconstrictores respecto al hígado normal [22, 25-27]. Diversas alteraciones contribuyen a esta respuesta

aumentada del hígado cirrótico a los vasoconstrictores: aumento en la cantidad del tejido contráctil (debido a la activación de las CHE y al aumento de miofibroblastos), déficit de sustancias vasodilatadoras, aumento de la densidad o cambio en la sensibilidad de receptores para vasoconstrictores, y producción secundaria de otras sustancias vasoconstrictoras.

La endotelina es el vasoconstrictor más estudiado en la circulación intrahepática. En la cirrosis hepática, tanto la producción intrahepática como la concentración circulante de endotelina están aumentadas [23, 28, 29]. La endotelina es capaz de aumentar la resistencia intrahepática del hígado cirrótico [30]. A pesar de los datos disponibles, su papel real en la hipertensión portal todavía no está aclarado.

Otro fenómeno de marcada importancia en la fisiopatología de la hipertensión portal es la aparición de colaterales portosistémicas, implicadas en complicaciones como la hemorragia por varices gastroesofágicas o la encefalopatía hepática. Estas colaterales se desarrollan como consecuencia del aumento de la presión en el sistema portal, proporcionando una ruta de descompresión hacia territorios de menor presión. Sin embargo, esta descompresión es ineficaz (los grados máximos de colateralización se relacionan con los grados máximos de hipertensión portal). La hipertensión portal se mantiene, a pesar del desarrollo de colaterales, debido al aumento concomitante del flujo portal. La formación de colaterales se relaciona no sólo con la apertura de canales preformados sino también con la neoformación de vasos colaterales mediante un proceso activo de neoangiogénesis [31, 32]. Dado que en estadios avanzados de la hipertensión portal hasta el 90% del flujo sanguíneo portal circula por las colaterales [33], es obvio que cambios en la resistencia portocolateral pueden modificar la presión portal. Estas colaterales tienen una notable cantidad de tejido muscular liso, pudiendo experimentar cambios activos en su diámetro y, por tanto, en las resistencias que ejercen al flujo sanguíneo. Diversos estudios realizados perfundiendo *in situ* el lecho portocolateral en ratas con hipertensión portal, han demostrado la presencia en estos vasos de receptores funcionales alfa y beta - adrenérgicos, serotoninérgicos, receptores V1 para vasopresina y receptores ET-A de la

endotelina [34-36]. Por otra parte, la somatostatina y el octreótido, aunque no tienen efecto vasoconstrictor directo sobre las colaterales, aumentan la respuesta de éstas a la endotelina [37]. Por consiguiente, los fármacos vasoconstrictores que se utilizan en la hipertensión portal, como el propranolol, la vasopresina y análogos, y la somatostatina y análogos, pueden ejercer parte de sus efectos beneficiosos a través de una reducción del flujo portocolateral. Sin embargo, este efecto sobre las colaterales atenúa su efecto reductor de la presión portal [38].

Síndrome de circulación hiperdinámica

En 1953 se describe por primera vez un “síndrome de circulación hiperdinámica” asociado a la presencia de hipertensión portal [39], y caracterizado por marcadas alteraciones en la hemodinámica sistémica: reducción de las resistencias vasculares periféricas, hipotensión arterial y aumento del gasto cardiaco [8]. Estas alteraciones son responsables de algunas de las manifestaciones clínicas más importantes del síndrome de hipertensión portal, como la ascitis, el síndrome hepatorrenal o el síndrome hepatopulmonar. Además, la circulación hiperdinámica produce un aumento del flujo portocolateral, que contribuye al mantenimiento y agravamiento de la hipertensión portal. Los dos principales mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo del síndrome de circulación hiperdinámica son la vasodilatación a nivel de la circulación periférica y esplácnica y la expansión del volumen plasmático [40]:

a) Vasodilatación esplácnica y sistémica: el aumento del flujo sanguíneo portocolateral es una de las principales manifestaciones del síndrome de circulación hiperdinámica, producido por una marcada vasodilatación arteriolar esplácnica. Por lo tanto, en la hipertensión portal se produce simultáneamente un aumento de flujo portal y un aumento de la resistencia al mismo. Esta es la base racional para utilizar en el manejo clínico de las complicaciones derivadas de la hipertensión portal fármacos vasoconstrictores, como la somatostatina y análogos, la vasopresina y análogos y los beta-bloqueantes no cardiosselectivos [7]. En dicho fenómeno se han implicado diversos factores, tanto alteraciones de

factores neurohormonales como de factores locales que actúan de forma paracrina:

- Óxido nítrico (ON): el ON se ha postulado como un mediador básico en el hiperaflujo esplácnico de la hipertensión portal debido a su efecto como factor relajante dependiente del endotelio vascular [41]. Numerosos estudios confirman su papel en el hiperaflujo esplácnico. Así, se ha confirmado que los pacientes con cirrosis tienen concentraciones aumentadas de nitritos y nitratos (provenientes de la oxidación de ON), siendo además la concentración mayor en sangre portal que en sangre periférica, lo que confirmaría su producción fundamentalmente en el lecho esplácnico [42]. Además, se ha demostrado una mayor producción esplácnica de ON en animales con hipertensión portal experimental respecto a controles [43], siendo el responsable de la hiporrespuesta vascular a vasoconstrictores característica de la hipertensión portal [44]. Su papel determinante en el hiperaflujo esplácnico se hace evidente al estudiar el resultado de su bloqueo en modelos experimentales de hipertensión portal; este bloqueo produce una reducción en la presión portal y en el flujo de la arteria mesentérica superior [45, 46], así como en el grado de shunt portosistémico [47], previniendo (si bien sólo parcialmente) el desarrollo de circulación hiperdinámica. En fases iniciales, el aumento en la producción de ON a nivel esplácnico se produce por un aumento en la actividad de eNOS, mediado por un aumento de su fosforilación dependiente de Akt [48]. En fases posteriores, existe un aumento de la expresión de eNOS tanto en la circulación esplácnica como en la sistémica; además existe un aumento en su actividad debido a un aumento de su interacción con su proteína reguladora Hsp90 [49]. Las señales que conducen a estas alteraciones sólo se conocen parcialmente y probablemente serán distintas a lo largo de la historia natural de la hipertensión portal. En fases posteriores el aumento del *estrés de rozamiento* asociado a la circulación hiperdinámica mantiene la producción de ON. En

fases avanzadas de la cirrosis, la traslocación bacteriana, mediante la activación de la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) y tetrahidrobiopterina, aumenta también la producción de ON [50]. Esta conexión entre traslocación bacteriana y alteraciones hemodinámicas en la hipertensión portal se ha confirmado ya en pacientes con cirrosis y ascitis [51]. Por otra parte, la creación de un shunt portosistémico, por sí solo, produce vasodilatación esplácnica y sistémica dependiente de ON [52]. Pese a los diversos mecanismos descritos en la hipertensión portal que contribuyen a aumentar la producción de ON, a día de hoy continúa sin conocerse un modelo que los integre y explique, de forma completa, por qué aumenta la producción de ON en la cirrosis. Debido al conocimiento sobre la implicación de ON en la cirrosis, se ha planteado en estos pacientes el bloqueo en la producción de ON como alternativa terapéutica, aunque hasta ahora los datos y la evidencia disponible son insuficientes. La administración sistémica del inhibidor de la NOS NG-monometil-L-arginina (L-NMMA) demostró en pacientes con cirrosis e hipertensión portal una mejoría en la hemodinámica sistémica, en la función renal y en la excreción de sodio [53]. Sin embargo, el efecto que ejerce inhibiendo al mismo tiempo la producción de ON a nivel hepático, produce un aumento en la resistencia hepática, eliminando el efecto beneficioso de reducir el flujo portocolateral y persistiendo la hipertensión portal [54]. Esto confirma la relevancia de la producción intrahepática de ON en la regulación de la resistencia hepática en la cirrosis [22]. Se requieren, por tanto, bloqueadores de ON selectivos a nivel de la circulación esplácnica y sistémica (sin efecto sobre la circulación hepática), o bien agentes que normalicen la función de ON a todos los niveles (pero sin bloqueo completo) [7].

- También la prostaciclina está implicada en la hipercirculación esplácnica al actuar como vasodilatador endotelial [55]. La producción esplácnica y sistémica de prostaciclina está aumentada en la hipertensión portal, como resultado del aumento en la

expresión de COX-1 y COX-2 [56]. La concentración de prostaciclina esta aumentada en pacientes con cirrosis [57], y la inhibición de la COX reduce la circulación hiperdinámica en este grupo de pacientes [58].

- Glucagón: el glucagón es el factor humoral implicado en la hiperemia esplácica del que más evidencia científica se dispone [59]. En pacientes con cirrosis existe un aumento en los niveles plasmáticos de glucagón, no sólo por una disminución del aclaramiento hepático sino también por un aumento de la producción por parte de las células alfa pancreáticas [60]. Los valores de glucagón se correlacionan con el flujo de la arteria mesentérica superior; además a nivel experimental se ha demostrado que la infusión de glucagón en ratas normales produce un aumento del flujo esplácico. La normalización en los niveles de glucagón mediante la administración de somatostatina revierte parcialmente el aumento del flujo esplácico [61]. La liberación de glucagón participa también en la hiperemia postprandial, que en los pacientes con cirrosis es responsable del aumento brusco de la presión portal [62]. La inhibición en la síntesis de glucagón ha proporcionado la base racional para el uso de somatostatina y sus análogos como tratamiento de las complicaciones de la hipertensión portal [63], si bien también tienen un efecto vasoconstrictor no relacionado con el glucagón.

b) Expansión del volumen plasmático: la expansión del volumen plasmático es el otro fenómeno necesario para que se desarrolle circulación hiperdinámica [64]. La retención de sodio es la alteración de la función renal más temprana y frecuente en pacientes con hipertensión portal, y es clave para la expansión del volumen plasmático [65]. La restricción de sodio en ratas con hipertensión portal evita la expansión de volumen plasmático, normalizando tanto el gasto cardiaco como el flujo esplácico [66]. También estudios realizados en pacientes con cirrosis han demostrado cómo la espironolactona disminuye la presión portal [67]. El estímulo inicial para la retención de sodio es la vasodilatación arterial,

que ocasiona una situación de infralleno relativo de la circulación, lo que produce la activación de barorreceptores y receptores de volumen, del sistema nervioso simpático, del sistema renina-angiotensina-aldosterona y la secreción de vasopresina [68]. La activación de estos sistemas conduce a la retención de sodio y agua por parte del riñón, con lo que aumenta el volumen plasmático [40].

Importancia clínica del síndrome de hipertensión portal

El síndrome de hipertensión portal es responsable de la mayoría de las complicaciones que marcan la transición desde un estado de cirrosis compensada a un estado de cirrosis descompensada: desarrollo de varices esófago-gástricas y hemorragia secundaria, ascitis, peritonitis bacteriana espontánea, encefalopatía hepática, síndrome hepatopulmonar o hipertensión portopulmonar. La aparición de estas complicaciones y la progresión de la enfermedad tienen implicación directa en el pronóstico y la supervivencia de los pacientes.

Aunque se han evaluado diferentes métodos diagnósticos para medir el grado de hipertensión portal (ecografía-doppler, medición directa de la presión en varices esofágicas mediante endoscopia, medición directa de la presión en la vena porta a través de punción transhepática o transyugular), el procedimiento más ampliamente utilizado en la práctica clínica es la medición del gradiente de presión venosa hepática (GPVH) mediante la inserción de un catéter balón en la vena suprahepática por vía transyugular o transfemoral [69]. La medición del GPVH ha demostrado capacidad para la correcta estimación del gradiente porto-cava en hipertensión portal sinusoidal secundaria a cirrosis hepática [70]. Por otra parte, si bien es un método diagnóstico invasivo, las complicaciones asociadas a la técnica son mínimas, con muy buena reproducibilidad de las mediciones, lo que le convierte en una prueba óptima para el seguimiento de la respuesta hemodinámica al tratamiento farmacológico o evaluación de la progresión de la hipertensión portal [71]. Además, si bien es una prueba generalmente bien tolerada, la sedación con dosis bajas de midazolam no condiciona cambios relevantes en la medición del GPVH [72].

La medida de hipertensión portal expresada como GPVH ha demostrado su importancia clínica en diferentes escenarios:

- a) Predicción de complicaciones. En los últimos años se ha introducido en la práctica clínica el término “hipertensión portal clínicamente significativa”, para definir un GPVH ≥ 10 mmHg, que permite identificar a pacientes con riesgo de desarrollar varices esofágicas [73]. Pero, mientras que con un GPVH < 12 mmHg el riesgo de hemorragia por varices esofágicas es prácticamente nulo (así como el riesgo de otras complicaciones como ascitis o encefalopatía hepática) [74], el aumento de GPVH por encima de este valor aumenta progresivamente el riesgo de estas complicaciones [75]. El GPVH también es útil como variable predictiva de descompensación en pacientes con enfermedad compensada, como se demostró en un estudio realizado en pacientes con cirrosis hepática compensada e HTP (sin varices esofágicas), donde el GPVH fue predictor independiente de descompensación clínica [HR 1.11 (1.05-1.17); $p < 0.05$][76]. En la misma línea, en otro estudio publicado posteriormente y realizado con pacientes con cirrosis compensada por hepatitis crónica C, el GPVH fue igualmente una variable predictiva independiente de descompensación tras una mediana de seguimiento de 25 meses [HR 2.76 (1.50-5.12); $p = 0.001$] [77].
- b) Utilidad como factor pronóstico en complicaciones agudas asociadas a hipertensión portal. El GPVH ha demostrado tener utilidad como factor pronóstico en determinadas complicaciones agudas de la hipertensión portal. Así, en el episodio de hemorragia digestiva aguda por varices esofágicas, la medición del GPVH de forma precoz (en las primeras 48 horas tras el episodio) puede aportar información útil en el manejo del paciente. Un GPVH ≥ 20 mmHg asocia alto riesgo de fracaso del tratamiento hemostático y de resangrado precoz (además de mayores requerimientos transfusionales, aumento de estancia en UVI y tiempo de hospitalización; así como una disminución de la supervivencia a 6 y 12 meses) [78]. Por ello, se propuso la realización de un abordaje terapéutico más agresivo, mediante la implantación precoz de una derivación porto-sistémica percutánea intrahepática (DPPI) en los

pacientes con hemorragia digestiva aguda por varices esofágicas y GPVH ≥ 20 mmHg. Este abordaje terapéutico agresivo precoz (junto con tratamiento endoscópico convencional) se asoció, en un estudio realizado, con menor mortalidad intrahospitalaria y a un año, menor estancia en UCI y menores requerimientos transfusionales [79]. También en la hepatitis aguda alcohólica el GPVH puede tener valor pronóstico, tal y como se demostró en un estudio realizado en pacientes ingresados por hepatitis aguda alcohólica grave (en función del índice de Maddrey), donde un GPVH > 22 mmHg se asoció de forma estadísticamente significativa al aumento de la mortalidad intrahospitalaria [80].

c) El GPVH ha demostrado tener utilidad como factor pronóstico en pacientes evaluados para cirugía de carcinoma hepatocelular, siendo la única variable predictiva independiente de descompensación tras la cirugía de resección en un estudio con 29 pacientes con cirrosis hepática compensada grado A de la clasificación de Child Pugh [81]. Recientemente una revisión sistémica (con inclusión de 11 estudios) ha confirmado igualmente la utilidad del GPVH como factor pronóstico de la cirugía del hepatocarcinoma. Así, la presencia de HTP clínicamente significativa (definida como.....) antes de la cirugía aumenta no sólo el riesgo de descompensación clínica tras la misma [OR: 3.04 (2.02-4.59); $p < 0.05$] sino también la mortalidad a 3 y 5 años [OR para 3 años: 2.09 (1.52-2.88; $p < 0.05$; OR para 5 años: 2.07 (1.51-2.84); $p < 0.05$][82].

d) Por otra parte, la respuesta hemodinámica al tratamiento farmacológico (cambios en el GPVH inducido por dicho tratamiento) han demostrado ser un fenómeno de gran trascendencia en la evolución de los pacientes con cirrosis. Aquellos que, con tratamiento betabloqueante, consiguen una disminución del GPVH $\geq 20\%$ respecto a su valor basal o por debajo de 12 mmHg tienen un riesgo muy bajo de padecer un primer episodio de hemorragia por varices (profilaxis primaria) o un resangrado tras haber sufrido un primer episodio de hemorragia (profilaxis secundaria) [83-85]. Dos metaanálisis han confirmado igualmente que la respuesta hemodinámica al tratamiento betabloqueante supone claro beneficio en términos de probabilidad de hemorragia por varices y supervivencia [86, 87]. Además, también se ha demostrado cómo la

respuesta hemodinámica al tratamiento betabloqueante se asocia con menor probabilidad de ascitis, síndrome hepatorenal, peritonitis bacteriana espontánea y encefalopatía hepática durante el seguimiento (así como con un aumento en la supervivencia) [86, 88]. Se pueden establecer tres categorías de respuesta hemodinámica al tratamiento farmacológico:

- Respuesta óptima: descenso del GPVH por debajo de 12 mmHg.
- Buena respuesta: descenso del GPVH $\geq 20\%$ respecto al valor basal.
- Ausencia de respuesta: descenso menor a los objetivos definidos previamente.

La diana terapéutica establecida en la práctica clínica habitual para el tratamiento farmacológico en la HTP es conseguir un GPVH menor a 12 mmHg o al menos una reducción $\geq 20\%$ respecto al valor inicial.

e) Por último, estudios recientes demuestran cómo el GPVH puede aumentar la capacidad de predicción de los modelos utilizados para predicción de supervivencia en pacientes con cirrosis. Así, en una serie retrospectiva de 393 pacientes, el GPVH fue una variable predictiva independiente de mortalidad en un modelo de riesgos proporcionales (HR, 1.03; IC 95%: 1.00-1.06; $p = 0.05$) ajustado por el MELD, la edad, y la existencia de ascitis o encefalopatía (cada incremento de 1 mmHg en el valor del GPVH, suponía un 3% más de riesgo de mortalidad independientemente del valor del MELD). Además, la inclusión en un modelo estadístico del GPVH y la edad junto con el MELD, fue capaz de incrementar la capacidad de éste para predecir el tiempo esperado de supervivencia [89].

IMPORTANCIA DE LA TRASLOCACIÓN BACTERIANA EN EL SÍNDROME DE HIPERTENSIÓN PORTAL.

Traslocación bacteriana (TB) es un término utilizado por primera vez en 1979 para definir el paso de bacterias viables desde la luz intestinal, a través de la pared intestinal, hacia los ganglios linfáticos mesentéricos (desde donde pueden pasar a la circulación sistémica o a otros órganos) [90]. Tradicionalmente, la TB exige la presencia de bacterias viables en los ganglios linfáticos mesentéricos, confirmado mediante la positividad de los cultivos realizados en dichos ganglios.

La TB es un proceso implicado en la fisiopatología de las infecciones en diferentes escenarios clínicos, como el shock hemorrágico, la obstrucción intestinal, traumatismos mayores o quemaduras, o pancreatitis aguda grave [91, 92].

La TB se ha descrito en el 25-30% de los pacientes cirróticos con deterioro de la función hepática [93]. Sin embargo, en estudios experimentales realizados en ratas con cirrosis y ascitis la prevalencia aumenta hasta un 45-78% [94-96]. La TB de bacterias viables en el paciente cirrótico juega un papel fundamental en el desarrollo de infecciones bacterianas espontáneas. Además, juega un importante papel también en los cambios hemodinámicos que se producen en la cirrosis avanzada (producido tanto por el paso de bacterias viables como por el paso de productos bacterianos no viables, como endotoxina o DNA bacteriano, fenómeno denominado “traslocación bacteriana no viable”).

Fisiopatología de la traslocación bacteriana en la cirrosis hepática

El conocimiento de la fisiopatología de la TB en la cirrosis esta basado fundamentalmente en estudios experimentales, debido a la dificultad obvia que implica la obtención de ganglios linfáticos mesentéricos en pacientes cirróticos. En estudios experimentales, la TB (definida como cultivo positivo en ganglios linfáticos mesentéricos) está presente en un 56% de ratas con cirrosis inducida por CCl₄ y ascitis, mientras que el porcentaje disminuye significativamente (0-10%) en ratas con cirrosis sin ascitis [96]. En estudios clínicos, los pacientes

con cirrosis y TB tienen un mayor deterioro de la función hepática (estimada por puntuación Child Pugh) que los pacientes sin TB [93].

Los tres principales mecanismos implicados en el desarrollo de TB en cirrosis son:

a) Sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SCBI): el SCBI es un síndrome muy heterogéneo definido por un aumento de la flora bacteriana intestinal ($\geq 10^5$ ufc/ml en aspirado obtenido de yeyuno proximal), pudiendo tratarse de un incremento tanto de la población global de bacterias como de una especie en concreto [97]. Estudios experimentales han demostrado cómo en ratas cirróticas con ascitis y TB es más frecuente la presencia de SCBI que en ratas sin TB [98]. Por el contrario, la ausencia de SCBI se asocia con una baja prevalencia de TB (0-11%), comparable a la observada en el grupo control [99]. No obstante, el hecho de que la TB no esté presente en hasta un 50% de ratas con SCBI sugiere que existen otros factores implicados en su patogénesis. De igual forma, estudios clínicos han demostrado que el SCBI es más frecuente en pacientes con cirrosis, sobre todo en aquellos con mayor insuficiencia hepática [100] o con episodios previos de peritonitis bacteriana espontánea [101] (no obstante, en estos estudios el diagnóstico de SCBI se realiza mediante test del aliento, que no es un método diagnóstico completamente fiable, debido a la dificultad para obtener aspirado yeyunal y realizar recuento de bacterias). La aparición de SCBI se debe fundamentalmente al enlentecimiento del tiempo de tránsito intestinal (si bien pueden influir otros factores como la acidez gástrica, una disminución de las secreciones biliopancreáticas o defectos de la actividad inmune local a nivel de la mucosa intestinal). El enlentecimiento del tránsito intestinal en la cirrosis se debe, entre otros factores, a un aumento de la actividad adrenérgica [98], de la síntesis de óxido nítrico [101] y del estrés oxidativo en la pared intestinal. El enlentecimiento del tránsito intestinal es un evento clínicamente relevante (independientemente de la causa que lo origine), puesto que la administración de procinéticos (como cisaprida o propranolol) ha demostrado una disminución significativa de la incidencia

de SCBI tanto en pacientes como en animales de experimentación [98, 102].

b) Aumento de la permeabilidad intestinal: la barrera intestinal está formada por una capa mucosa secretada por las células epiteliales intestinales y por el epitelio intestinal en sí mismo, que forma una capa con uniones intercelulares especializadas (*tight junctions*) que permite el paso selectivo de sustancias desde la luz intestinal (permeabilidad paracelular selectiva). En la cirrosis se han descrito alteraciones estructurales y funcionales en la mucosa que aumentan la permeabilidad intestinal, permitiendo el paso de bacterias y productos bacterianos. Respecto a las alteraciones estructurales que aumentan la permeabilidad, estudios experimentales han demostrado fenómenos de congestión mucosa, dilatación de los espacios intercelulares y cambios inflamatorios submucosos [103-105]. Aún así, no se ha podido aclarar si estas alteraciones estructurales son causa o consecuencia de la TB. También se han descrito alteraciones funcionales que contribuyen a aumentar la permeabilidad. El daño oxidativo existente a nivel de la mucosa intestinal [106], la endotoxemia, niveles elevados de óxido nítrico y citoquinas proinflamatorias son fenómenos que aumentan la permeabilidad intestinal en la cirrosis [107, 108]. Diversos estudios han demostrado en pacientes con cirrosis avanzada un aumento de la permeabilidad a macromoléculas, especialmente en pacientes con episodios previos de peritonitis bacteriana espontánea o encefalopatía hepática [109] o sepsis [110]. No obstante, la mayoría de los estudios en pacientes con cirrosis están realizados con sustancias que miden la permeabilidad paracelular (como la lactulosa), mientras que la TB de bacterias viables sigue fundamentalmente una ruta transcelular. El aumento de la permeabilidad intestinal, por sí sólo, no parece ser un factor determinante en la patogénesis de la TB. Estudios experimentales han demostrado que la TB ocurre hasta en un 87% de ratas con aumento de permeabilidad intestinal y SCBI, mientras que ningún animal con únicamente aumento de permeabilidad intestinal (sin SCBI) mostró TB [98]. Es más, sólo el tratamiento del SCBI, sin influir sobre la permeabilidad, ha demostrado en estudios experimentales disminuir la tasa de TB en ratas cirróticas [111].

c) Alteraciones del sistema inmune: en sujetos inmunocompetentes, las bacterias viables que se translocan a ganglios linfáticos mesentéricos o a la vena porta son habitualmente fagocitadas y neutralizadas antes de adquirir un significado patológico [112, 113]. En los pacientes con cirrosis, diversas alteraciones en la inmunidad local o sistémica permiten el paso de bacterias a la circulación general, convirtiendo este proceso en clínicamente relevante [114]. La primera barrera defensiva del sistema inmune del organismo es el tracto digestivo. El intestino se considera un órgano inmunológicamente activo, que contiene prácticamente todas las células implicadas en la respuesta inmune. El tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (MALT) es el sistema inmune del organismo más extenso, formado por cuatro componentes: las placas de Peyer, los linfocitos de la lámina propia (que incluyen las células dendríticas), los linfocitos intraepiteliales y los ganglios linfáticos mesentéricos. Todos estos componentes intervienen en la respuesta inmune innata y adaptativa. La cirrosis avanzada se asocia con una alteración de la respuesta inmune tanto celular como humoral [115, 116] que se correlaciona con la probabilidad de desarrollar peritonitis bacteriana espontánea [117]. La cirrosis también se asocia a una disminución de la actividad del sistema retículoendotelial (SRE), uno de los principales mecanismos de defensa frente a bacteriemias e infecciones adquiridas por vía hematógena. La presencia de shunt portosistémicos en la circulación hepática y la disminución en la capacidad fagocítica de las células de Kupffer, también se ha asociado al desarrollo de bacteriemia y de peritonitis bacteriana espontánea [118]. Esta alteración del SRE no sólo disminuye la capacidad de eliminación de bacterias viables, sino también de productos bacterianos no viables como endotoxina o DNA bacteriano. Esta traslocación y circulación sistémica de productos bacterianos condiciona una respuesta inflamatoria crónica que produce un empeoramiento de las alteraciones hemodinámicas observadas en los pacientes cirróticos. Además, la respuesta inflamatoria crónica condiciona la síntesis de citoquinas proinflamatorias (particularmente TNF alfa), interleucinas y óxido nítrico, que contribuyen a aumentar el estrés oxidativo en la mucosa intestinal [119]. Estudios experimentales

realizados en ratas cirróticas con ascitis han demostrado cómo la administración de anticuerpos monoclonales antiTNF-alfa disminuyen significativamente la tasa de TB [120]. Este estrés aumenta la permeabilidad intestinal, favoreciendo el paso continuo de bacterias y productos bacterianos perpetuando así el fenómeno de TB.

Diagnóstico de traslocación bacteriana

El estudio de la TB en humanos está limitado por la dificultad para obtener ganglios linfáticos mesentéricos en los que confirmar el diagnóstico con cultivo.

La proteína transportadora LBP se sintetiza en el hígado como respuesta a la bacteriemia o a la endotoxemia, por lo que ha sido propuesta como un marcador de TB. Los pacientes con niveles elevados de LBP en suero han mostrado un estado de respuesta inflamatoria crónica y un mayor deterioro de las alteraciones hemodinámicas, que pueden ser revertidas tras la descontaminación intestinal con norfloxacin [51]. De igual forma, un estudio prospectivo realizado en pacientes cirróticos con ascitis sin evidencia de infección mostró un aumento significativo del riesgo de desarrollar infecciones bacterianas en los pacientes con LBP elevado, con respecto a los pacientes con LBP normal [121]. No obstante, los niveles elevados de LBP sólo reflejan la traslocación de bacilos gram negativos, sin ser útiles como marcadores de la traslocación de cocos gram positivos, lo que supone un inconveniente para su uso [122]. En los últimos años la detección de DNA bacteriano en suero mediante PCR ha sido propuesto como marcador de la TB en humanos. La presencia de DNA bacteriano en suero y líquido ascítico ha sido detectada en un tercio de pacientes con cirrosis y ascitis, a pesar del cultivo negativo en dicho líquido ascítico [123, 124], un valor similar al descrito en otros estudios en humanos [93]. La detección de DNA bacteriano en fluidos biológicos de animales de experimentación con cirrosis inducida y ascitis está asociada con la presencia simultánea de DNA bacteriano en los ganglios linfoides mesentéricos, independientemente de cultivo positivo o negativo [125]. Estos datos apoyan la hipótesis de que la detección de DNA bacteriano en fluidos biológicos (suero, líquido ascítico) de pacientes con cirrosis avanzada es un marcador para el diagnóstico de TB. No obstante, la detección de DNA bacteriano no siempre

implica el paso de bacterias viables, por lo que las consecuencias clínicas de la traslocación de DNA bacteriano pueden ser diferentes a las de la traslocación de bacterias viables.

Consecuencias clínicas de la traslocación bacteriana en cirrosis

La TB es el principal mecanismo fisiopatológico implicado en el desarrollo de infecciones en el paciente cirrótico.

Las infecciones bacterianas son frecuentes en pacientes cirróticos, con una incidencia al ingreso o durante su hospitalización en torno a un 32% [126, 127]. Las infecciones más frecuentes en los pacientes cirróticos son la peritonitis bacteriana espontánea, las infecciones del tracto urinario y la neumonía. El 80% de las infecciones están causadas por bacilos gram negativos (fundamentalmente *E. Coli*), lo que sugiere que la mayoría de las infecciones en pacientes con cirrosis son de origen entérico y que, como hemos comentado, la TB es un factor fundamental en su fisiopatología.

Las complicaciones infecciosas en los pacientes con cirrosis son de especial importancia en la práctica clínica por su clara asociación con un peor pronóstico y un aumento de la mortalidad [128].

Pero, además de su implicación en el desarrollo de infecciones en la cirrosis hepática, la traslocación de bacterias viables o productos bacterianos produce alteraciones a otros niveles con repercusión clínica igualmente significativa.

Así, la TB activa de forma inmediata el sistema inmune innato (que incluye péptidos antimicrobianos, macrófagos, células dendríticas y la vía alternativa del complemento) controlando rápidamente la replicación de los patógenos. Los receptores *toll like* (RTL) son un tipo de proteínas de membrana que intervienen en la respuesta inmune innata reconociendo diversos patrones moleculares conservados de los patógenos (MAMP). Se reconocen hasta 10 receptores RTL, cada uno de los cuales reconoce determinados PAMP. Los más estudiados en la cirrosis hepática y la TB son los RTL-4 (que reconocen endotoxina producida por bacilos gram negativos), los RTL-2 (que se activan ante la presencia de peptidoglicano, componente de cocos gram positivos) y los

RTL-9 (que se activan frente a DNA bacteriano, ya sea de bacilos gram negativos o cocos gram positivos). Tanto la activación de estos receptores (mediante la producción de citoquinas proinflamatorias y TNF alfa) como la liberación de productos bacterianos inducen en pacientes con cirrosis descompensada una respuesta inflamatoria crónica que contribuye a empeorar las alteraciones hemodinámicas, sobre todo la vasodilatación esplácnica y la circulación hiperdinámica, probablemente por un incremento en la producción de ON (mediado tanto por la eNOS como por la iNOS). Estudios experimentales demuestran como ratas cirróticas con TB tienen una actividad aumentada de la eNOS en la vasculatura mesentérica, mediada por un aumento en los niveles de TNF alfa y del cofactor de la eNOS tetrahidrobiopterina [114]. Estudios clínicos han demostrado como pacientes con cirrosis y niveles elevados de LBP (marcador de TB) tienen mayores trastornos hemodinámicos que pueden mejorar tras la descontaminación intestinal con norfloxacino [51]. Además, la traslocación de DNA bacteriano en pacientes con ascitis e hipertensión portal agrava la disfunción circulatoria sistémica y la vasodilatación periférica, lo que se ha relacionado con un aumento de la respuesta inflamatoria sistémica (estimado por niveles séricos elevados de TNF alfa) [129].

El empeoramiento de la circulación hiperdinámica y del estado de inflamación crónica producido por la TB puede jugar un papel fundamental en complicaciones clínicas derivadas de la hipertensión portal:

- a) Síndrome hepatorenal (SHR): Estudios clínicos realizados en pacientes con cirrosis y ascitis refractaria han demostrado como la traslocación de DNA bacteriano se asocia con un deterioro de la función cardiovascular y renal en estos pacientes, con mayor riesgo de SHR y muerte [130]. Por otra parte, se ha demostrado que la administración de un antibiótico no absorbible (rifaximina) mejora las alteraciones hemodinámicas y la función renal en pacientes con cirrosis avanzada [131]. Resultados similares han sido confirmados con otros antibióticos como el norfloxacino, demostrando en un ensayo clínico como su administración en pacientes con cirrosis avanzada y ascitis se asocia con una menor incidencia de SHR [132].

b) Las alteraciones hemodinámicas y el estado de inflamación crónica inducido por la TB también tienen un efecto deletéreo sobre la presión portal intrahepática. La endotoxemia, así como la liberación de citoquinas proinflamatorias, estimulan la producción de endotelina-1 a nivel intrahepático. La endotelina 1 es el más potente activador de la contracción de las células estrelladas hepáticas, que tienen un importante papel en la regulación de la hipertensión portal intrahepática en la cirrosis (su activación produce un aumento del tono vascular intrahepático y de la resistencia al flujo venoso portal). Durante la TB, la endotoxemia produce un aumento de sustancias vasoconstrictoras, como la endotelina, respecto a sustancias vasodilatadoras, que conllevan el aumento del tono vascular intrahepático [133]. Esto puede causar un aumento agudo de la presión portal en los pacientes con cirrosis, con riesgo de desarrollar hemorragia digestiva por varices esofágicas [134]. Un estudio reciente realizado en pacientes con cirrosis y ascitis demostró que los pacientes con DNA bacteriano presentaban mayor aumento postprandial del GPVH que los pacientes sin DNA bacteriano [129].

c) También hay evidencia en la literatura de la influencia del fenómeno de TB sobre la patogénesis de la encefalopatía hepática en los pacientes con cirrosis. No existe duda de que la infección bacteriana en los pacientes con cirrosis es una de las causas más frecuente que desencadena los episodios de encefalopatía hepática. También los estudios realizados previamente sobre la fisiopatología de la encefalopatía hepática han demostrado un efecto deletéreo de las toxinas a nivel cerebral. No obstante, en los últimos años se ha demostrado como el estado inflamatorio crónico y la infección ejercen un efecto sinérgico junto con las toxinas (como el amonio) en la patogénesis de la encefalopatía hepática [135, 136]. La respuesta inflamatoria crónica inducida por la TB (incluyendo la traslocación de productos bacterianos no viables) puede tener un papel en la patogénesis de la encefalopatía. Un reciente estudio realizado en pacientes con cirrosis ha demostrado como la TB (definida como la presencia de DNA bacteriano) se asocia con una mayor prevalencia de encefalopatía hepática [137]. Igualmente se ha

demonstrado una relación entre el SCBI (fenómeno implicado en la TB) y la encefalopatía hepática mínima en pacientes con cirrosis [138]; además, la administración de rifaximina mejora la encefalopatía hepática mínima en algunos estudios clínicos [139, 140].

d) Debido al estado de inflamación crónica inducido por la TB y al efecto deletéreo que produce sobre las alteraciones hemodinámicas, este fenómeno puede tener también influencia en el pronóstico de la cirrosis. En un estudio multicéntrico realizado en más de 150 pacientes cirróticos con ascitis no neutrocítica, los pacientes con DNA bacteriano en líquido ascítico y plasma tenían peor pronóstico que los pacientes sin DNA bacteriano. La principal causa de mortalidad fue el deterioro agudo de la función hepática, sugiriendo que la TB se asocia a un deterioro hemodinámico y clínico del paciente con cirrosis hepática [141]. También la detección de DNA bacteriano en pacientes con deterioro grave de la función hepática (MELD > 15) se ha asociado con una mayor mortalidad [142]. Además, medidas terapéuticas sobre la TB, como la descontaminación intestinal, ha demostrado en pacientes cirróticos mejorar la supervivencia [132, 143], mejorar los parámetros de función hepática [144] y mejorar otras complicaciones asociadas a la hipertensión portal como la trombocitopenia [145].

Manipulación farmacológica de la traslocación bacteriana

La mayoría de las terapias utilizadas para la prevención de la TB en la cirrosis van dirigidas a disminuir el SCBI y a modificar la flora bacteriana intestinal. Estos factores asociados a la TB son más fácilmente modificables que el aumento de la permeabilidad intestinal o la disminución de la capacidad inmune (factores, como hemos visto, también implicados en la TB). Las opciones terapéuticas estudiadas y más utilizadas en la práctica clínica habitual para prevenir la TB son:

- a) Descontaminación selectiva intestinal, basada en la administración de antibióticos que selectivamente eliminan las bacterias gram negativas a nivel intestinal, como el norfloxacino. Si bien en estudios

clínicos la administración de norfloxacin produce una marcada reducción en el recuento fecal de bacterias gram negativas (aunque sin efecto sobre cocos gram positivos o anaerobios) [146], a nivel experimental los resultados obtenidos con la administración oral de norfloxacin o trimetoprim-sulfametoxazol son controvertidos. Mientras algunos estudios muestran disminución de la TB (sobre todo de bacterias gram negativas) [111, 147, 148], otros no han demostrado beneficio [149]. No obstante, estudios realizados en pacientes cirróticos han demostrado como la descontaminación selectiva intestinal previene infecciones bacterianas en pacientes con hemorragia digestiva por varices [150, 151] o con proteínas disminuidas en líquido ascítico [152]. Igualmente la descontaminación selectiva intestinal ha demostrado ser eficaz en la prevención de la recurrencia de la peritonitis bacteriana espontánea [146]. Pero, si bien la mayoría de estudios realizados para valorar el efecto de antibióticos en la TB tienen como objetivos primarios la evaluación de eventos infecciosos, también se han descrito resultados interesantes acerca del efecto de la administración de antibióticos sobre las alteraciones hemodinámicas en la cirrosis. Así, en un estudio realizado en pacientes con cirrosis la administración de norfloxacin durante un mes demostró mejoría en los parámetros hemodinámicos (aumento de la presión arterial media, aumento de la resistencias vasculares sistémicas, disminución de gasto cardiaco, tendencia a disminución de la presión portal) [152], sugiriendo que el estado de circulación hiperdinámica en la cirrosis puede ser mejorado mediante la modulación de la microflora intestinal y de la TB [51, 148, 153, 154]. Sin embargo, el uso prolongado de antibióticos favorece la aparición de infecciones por gérmenes resistentes a antibióticos, lo que hace necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos no antibióticos para modificar el SCBI y la TB [126, 155].

b) Modificación del tiempo de tránsito intestinal. Como hemos comentado previamente, uno de los factores implicados en el SCBI y en la TB es el enlentecimiento del tránsito intestinal que presentan los pacientes con cirrosis, por lo que se ha estudiado el efecto de

medicamentos que aumentan la motilidad intestinal disminuyendo el tiempo de tránsito intestinal. Así, el propranolol (bloqueante β -adrenérgico no selectivo) ha demostrado acortar el tiempo de tránsito intestinal, así como el SCBI y la TB, en ratas con cirrosis (si bien no hubo diferencias en la tasa de infección de líquido ascítico) [98]. La cisaprida, un procinético intestinal, también ha demostrado acortar el tiempo de tránsito intestinal, eliminar el SCBI y disminuir la TB en ratas con cirrosis [102, 156]. En estudios clínicos, la administración de cisaprida produce igualmente una disminución del tiempo de tránsito oro-fecal y la eliminación del SCBI en pacientes con cirrosis, así como una tendencia a menor incidencia de infecciones en estos pacientes [157].

UTILIDAD DE PREPARADOS PROBIÓTICOS EN LA CIRROSIS HEPÁTICA

La microbiota intestinal (antes denominada microflora bacteriana intestinal) [158, 159] es un ecosistema formado por varias especies bacterianas y gran variedad de cepas, presentes en la luz intestinal y en íntimo contacto con el epitelio intestinal. Los microorganismos que constituyen la microbiota intestinal se reparten desigualmente a lo largo de todo el tracto digestivo, siendo más abundantes en intestino delgado distal, ciego y colon (donde se han descrito hasta $2.8-6 \times 10^{11}$ unidades formadoras de colonias por cada gramo de contenido intestinal, lo que supone aproximadamente el 60% de toda la masa fecal en humanos) [160]. Se han descrito más de 500 especies de bacterias formando parte de la microbiota intestinal, casi todas anaerobias. La mayoría de ellas aún no han podido ser identificadas debido a la imposibilidad de realizar cultivos *ex vivo* con los medios disponibles. Aunque la composición de la microbiota intestinal se considera específica de cada individuo, existe un grupo de bacterias que son comunes a todos ellos. La mayoría de los microorganismos son bacterias productoras de ácido láctico (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*,

Carnobacterium, *Tetragenococcus*, *Vanococcus*, *Weisella*) [161]. Esta microbiota tiene capacidad para la producción de ácido láctico y para la digestión anaerobia de los hidratos de carbono; además tiene capacidad para sintetizar micronutrientes, entre ellos vitaminas o ácidos grasos de cadena corta. Los productos de fermentación de estas bacterias aportan al individuo hasta el 10% de la cantidad diaria de energía necesaria [162].

La microbiota intestinal, junto con el epitelio intestinal y la secreción mucosa, es un componente activo de la “barrera mucosa intestinal”, un efectivo sistema de defensa contra factores potencialmente patógenos presentes en la luz intestinal. Además, tiene capacidad para modificar la motilidad y la perfusión de la pared intestinal, estimula el sistema inmune mucoso local y reduce la TB [163].

La microbiota intestinal de cada individuo puede ser continuamente modificada por distintos factores físicos, químicos o biológicos, pudiendo condicionar un disbalance de las distintas bacterias que resulta en una potencial causa de enfermedad, tanto a nivel digestivo como en otros sistemas del organismo. Cambios en la cantidad total de bacterias, en la distribución, en las cepas o en su capacidad metabólica pueden ocurrir, y generar enfermedades en el individuo o actuar como cofactor [164].

Los preparados probióticos son preparados farmacológicos de microorganismos vivos (monocultivos, cultivos mixtos) que, administrados en la cantidad adecuada, proporcionan efectos beneficiosos en el individuo, mejorando las propiedades de su propia microbiota intestinal (induciendo cambios tanto en la población de bacterias como en su capacidad metabólica) [165, 166]. Tradicionalmente los probióticos se han incorporado en una amplia variedad de alimentos o como suplementos nutricionales. Su comercialización en forma de preparados farmacológicos en los últimos años condiciona la aparición constante de evidencia científica (tanto en investigación experimental como clínica) sobre su utilidad en multitud de enfermedades.

Sin duda, el campo donde existe mayor evidencia científica sobre el uso de probióticos es el de las enfermedades gastrointestinales [167]:

- a) Diarrea aguda en la infancia: numerosos estudios han confirmado como el uso de probióticos en diarrea aguda en la infancia acorta la duración de la enfermedad [168-170].
- b) Prevención de diarrea asociada a antibióticos y diarrea asociada a *C. Difficile*: se ha descrito un efecto beneficioso de los probióticos mediante la prevención de diarrea asociada a antibióticos en pacientes hospitalizados, así como en la prevención de la recurrencia de infección por *C. Difficile* [171, 172]. No obstante, la evidencia del efecto beneficioso de los probióticos sobre la prevención de la diarrea asociada a antibióticos es mayor (se ha descrito una reducción de la incidencia de hasta un 40-60%) [173]; los resultados de los estudios realizados en diarrea por *C. Difficile* son más controvertidos [174, 175].
- c) Uso de probióticos en enfermedad inflamatoria crónica intestinal: el uso de probióticos ha demostrado ser beneficioso en la prevención de la reservoritis, así como en el mantenimiento de la remisión obtenida con antibioterapia [176-178]. También se ha descrito la utilidad de los probióticos en la inducción y mantenimiento de la remisión en pacientes con colitis ulcerosa con actividad leve-moderada [179-182].
- d) Los probióticos han demostrado disminuir la incidencia y la mortalidad asociada a los episodios de enterocolitis necrotizante en recién nacidos de bajo peso [183, 184].
- e) También se ha estudiado la posible utilidad de los probióticos sobre otras patologías, si bien la evidencia disponible hasta ahora es escasa y en algunos casos controvertida. El síndrome del intestino irritable (SII) es una patología con una prevalencia descrita de hasta un 10-15% y con repercusión significativa sobre la calidad de vida así como sobre los costes sanitarios, donde también se ha evaluado la utilidad de los probióticos. Las conclusiones sobre su efectividad en el SII varían entre los distintos meta-análisis publicados, debido a la variabilidad de estudios publicados (tamaño muestral inadecuado, estudio mal diseñado, utilización de distintas cepas y probióticos no comparables, etc.). También en el tratamiento de la enteritis por radiación se ha evaluado la utilidad de los probióticos, con algunos estudios clínicos que confirman efecto beneficioso de los probióticos en el control y prevención de la

sintomatología [185, 186]. Por último, también se ha evaluado la utilidad de los probióticos en la prevención y tratamiento de la dermatitis atópica y otros procesos alérgicos con resultados esperanzadores [187, 188], si bien es preciso la realización de más estudios.

Condición clínica	Grado de recomendación
Tratamiento de diarrea infecciosa en niños	A
Prevención de diarrea asociada a antibióticos	A
Prevención de diarrea asociada a <i>C. Difficile</i> / prevención de recurrencia	B/C
Prevención / mantenimiento de remisión de reservoritis	A
Inducción de remisión de reservoritis	C
Inducción re remisión de colitis ulcerosa	B
Mantenimiento de remisión de colitis ulcerosa	A
Tratamiento de síndrome de intestino irritable	B/C
Tratamiento de enterocolitis necrotizante	B
Tratamiento / prevención de eccema atópico asociado a alergia a proteínas de leche de vaca	A
Tratamiento de enteritis por radiación	C

Tabla 1: Recomendaciones para uso de probióticos [189]. Grado de recomendación A: recomendación basada en evidencia a estudios controlados bien diseñados, con resultados positivos de gran consistencia, publicados en la literatura (no abstract). Grado de recomendación B: basada en evidencia a estudios controlados con resultados positivos, aunque con presencia de algunos estudios con resultado negativo. Grado de recomendación C: recomendación basada en algunos estudios con resultados positivos, aunque claramente insuficientes para establecer grado A ó B

Por otra parte, se ha demostrado la seguridad de los probióticos y la práctica ausencia de efectos adversos significativos en los múltiples estudios realizados. Un largo historial de seguridad ha sido demostrado para *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* cuando se han administrado en productos alimentarios fermentados o en productos lácteos. El perfil de seguridad de los productos farmacológicos probióticos es igualmente alto, con muy pocos efectos adversos descritos en la literatura. No obstante, debemos tener en cuenta infecciones derivadas del uso de probióticos descritas en pacientes críticamente enfermos. Así, el uso de *Lactobacillus* se ha relacionado con la aparición de infecciones como bacteriemia, endocarditis o abscesos [190] en pacientes con factores de riesgo asociados como intestino corto o portador de catéter venoso central (CVC). También de forma excepcional (teniendo en cuenta el uso tan

extendido de este probiótico) se han descrito casos de fungemia asociados al uso de *Saccharomyces Boulardii* en pacientes con enfermedades graves asociadas, planteando como origen una posible colonización del catéter al abrir el probiótico [191]. En la misma línea, un estudio publicado en 2005 confirmó casos de fungemia por *Saccharomyces cerevisiae* en pacientes ingresados en UCI que recibieron *Saccharomyces Boulardii* como tratamiento farmacológico, relacionando la infección con la apertura de las cápsulas de probióticos para su administración por sonda enteral. Además de plantear su administración enteral como posible vía de infección, la presencia de levaduras viables en el ambiente tras la apertura de las cápsulas se planteó como fuente de contagio de catéteres venosos centrales o incluso posibilidad de transmisión a pacientes vecinos [192].

Aún teniendo en cuenta los casos descritos previamente, la seguridad de los probióticos ha sido demostrada indirectamente mediante un estudio de vigilancia de bacteriemias realizado en Finlandia; mientras el consumo de *Lactobacillus GG* se incrementó desde 1 litro a 6 litros por persona entre los años 1990 y 2000, la prevalencia de bacteriemias por *Lactobacillus* entre estos años no se modificó [193].

Uso de probióticos en enfermedades hepáticas

El uso de los probióticos en el tratamiento de enfermedades hepáticas se basa en su capacidad para potenciar la función de la barrera mucosa intestinal y para prevenir el fenómeno de traslocación bacteriana [194]. Además, el efecto sistémico de infrarregulación sobre citoquinas proinflamatorias (sobretudo TNF alfa) que se produce con la administración de probióticos ha justificado su uso en la esteatohepatitis no alcohólica.

Pese al efecto que los probióticos pueden tener sobre la traslocación bacteriana y a la importancia de este fenómeno en la cirrosis hepática (como hemos visto anteriormente) hasta ahora existen muy pocos estudios y evidencia científica sobre el efecto de los probióticos en las complicaciones derivadas de la cirrosis y de la hipertensión portal. De acuerdo con las guías de práctica clínica sobre el uso de probióticos publicadas por la Organización Mundial de

Gastroenterología, en el contexto de enfermedades hepáticas podrían estar indicados en el manejo de la encefalopatía hepática [138]. Sin embargo, como veremos a continuación, existe cierta evidencia de la utilidad de los probióticos no sólo en la encefalopatía hepática sino también en otras complicaciones derivadas de la cirrosis y en otras enfermedades hepáticas.

a) Esteatohepatitis no alcohólica (EHNA): ya que tanto el sobrecrecimiento bacteriano como el aumento de citoquinas proinflamatorias son fenómenos claves en la etiopatogenia de la EHNA, se ha postulado la utilidad de los probióticos en el tratamiento de esta enfermedad [195]. El efecto beneficioso de los probióticos en la EHNA ha sido descrito en algunos estudios experimentales. En un estudio realizado sobre un modelo experimental de esteatosis hepática no alcohólica, el tratamiento con el probiótico VSL#3 ó anticuerpos anti TNF alfa produce una mejoría en la histología hepática, una disminución en la cantidad de ácidos grasos a nivel de los hepatocitos, una disminución en los niveles de ALT y en la expresión de TNF alfa [196]. Mientras algunos estudios experimentales sugieren que la administración de VSL#3 podría limitar el daño oxidativo e inflamatorio a nivel hepático [197], otros demuestran efecto de VSL#3 sobre la fibrosis hepática pero sin modificar el estado inflamatorio [198]. A pesar de la evidencia disponible desde estudios experimentales, prácticamente no existen estudios clínicos que demuestren un efecto beneficioso de los probióticos en la EHNA y que permitan sacar conclusiones aplicables a la práctica clínica habitual. Únicamente un estudio preliminar realizado en 10 pacientes con EHNA y 10 pacientes con cirrosis alcohólica demostró que la administración de probióticos (bacterias ácido lácticas) mejoraba los niveles de ALT y GGT, disminuyendo también de forma estadísticamente significativa los niveles de TNF alfa (si bien este estudio no dispone de grupo control) [199].

b) Encefalopatía hepática: la implicación de la hiperamonemia existente en pacientes con cirrosis hepática sobre el desarrollo de encefalopatía (hiperammonemia producida por la microflora intestinal) ha llevado a plantear el uso de probióticos en el tratamiento de esta complicación. De hecho, la modulación de la microflora intestinal es la

base racional para el uso de los fármacos que habitualmente se utilizan en la encefalopatía hepática, lactulosa y antibióticos no absorbibles (rifaximina, neomicina). A nivel experimental muy pocos estudios han evaluado el efecto de probióticos sobre la encefalopatía hepática; no obstante, un estudio valoró la eficacia del preparado probiótico *Golden Bifid* en ratas con cirrosis inducida y encefalopatía hepática (el diagnóstico de encefalopatía en ratas se realizó al comprobar la prolongación del tiempo de latencia de los potenciales evocados auditivos del tronco cerebral), demostrando en el grupo de administración de probióticos una disminución de los niveles de endotoxemia y amonemia en sangre, mejoría en la histopatología hepática y disminución de la incidencia de encefalopatía hepática respecto al grupo control (sin tratamiento específico de la encefalopatía) [200]. Los estudios clínicos realizados en humanos han evaluado fundamentalmente el efecto de los probióticos sobre la encefalopatía hepática mínima (deterioro de las funciones cognitivas como pérdida de la capacidad de atención o deterioro de las funciones motoras que sólo pueden ser diagnosticadas mediante test neurofisiológicos específicos, y que se ha descrito hasta en un 30-70% de pacientes cirróticos sin evidencia de encefalopatía hepática). El primer estudio publicado por Loguercio en 1995 comparó el efecto de la administración de *Enterococcus faecium* SF 68 respecto al de lactulosa en pacientes con encefalopatía hepática, demostrando como en el grupo de la administración de probióticos disminuían los niveles de amonio en sangre y mejoraban los test neurocognitivos. Esta mejoría en los test se mantenía tras la finalización de la administración del probiótico [199]. Otro estudio realizado sobre 97 pacientes con encefalopatía hepática mínima demostró como la administración de un producto simbiótico (mezcla de probióticos y prebióticos) disminuía los niveles de amonio en sangre y mejoraba los síntomas de la encefalopatía [201]. Resultados similares mostró otro estudio realizado en 60 pacientes cirróticos con la administración de *Bifidobacterium longum* con fructo-oligosacáridos (mejoría en los test de encefalopatía hepática mínima y disminución de los niveles de amonio en sangre) [202]. Según la evidencia disponible, actualmente los probióticos están incluidos en algunas recomendaciones

sobre tratamiento de la encefalopatía hepática mínima [203]. En el caso de la encefalopatía hepática con manifestaciones clínicas evidentes la evidencia disponible sobre la utilidad de probióticos es aún muy escasa. Un ensayo clínico reciente realizado en pacientes cirróticos ha evaluado la utilidad de los probióticos como prevención secundaria de encefalopatía hepática (tras un episodio clínicamente relevante) en comparación con la administración de lactulosa y la ausencia de tratamiento, demostrando como la administración de probióticos es igual de eficaz que la administración de lactulosa (sin diferencias entre ambos grupos) en la prevención de nuevos episodios de encefalopatía hepática (ambas medidas son superiores a la ausencia de tratamiento) [204]. De igual forma, un ensayo clínico publicado en 2014 ha evaluado la utilidad de los probióticos para prevención secundaria de encefalopatía hepática en comparación con la administración de lactulosa o rifaximina, observando en el grupo de tratamiento con probióticos una tendencia a disminución en los episodios de encefalopatía hepática (34.8% vs 51.6% [HR 0.65 (0.38–1.11); $P = .12$]) que condiciona una disminución estadísticamente significativa en la necesidad de ingreso (19.7% vs 42.2% [HR 0.45 (0.23–0.87); $P = .02$]) [205].

c) Prevención de infecciones bacterianas: los probióticos han demostrado disminuir la traslocación bacteriana en pacientes con traumatismos mayores y grandes quemados, así como en modelos experimentales de pancreatitis aguda [206, 207]. En estudios experimentales realizados sobre ratas cirróticas, la administración de *Lactobacillus GG* no consiguió disminuir la prevalencia de traslocación bacteriana (sin conseguir tampoco modificar la flora fecal), sugiriendo que puede ser necesario modificar la composición de los probióticos o la cantidad de bacterias administradas para conseguir efecto [208]. Estudios clínicos han demostrado como la administración de un producto simbiótico [209] o de *E. Coli Nissle* [210] disminuyen los niveles de endotoxemia en pacientes con cirrosis, si bien el significado clínico de esta disminución aún no ha sido verificado. Rayes realizó estudios clínicos para valorar la utilidad de los probióticos en la prevención de infecciones tras el trasplante hepático. En uno de ellos comparó la administración de *L.*

Plantarum 299 y fibra respecto a la descontaminación selectiva intestinal, objetivando como el grupo que recibió probióticos tenía menor tasa de infecciones [211]. En un segundo estudio, la administración del producto Synbiotic 2000 durante 14 días a pacientes trasplantados disminuía la tasa de infección a los 30 días [212]. Pese al estado de inmunosupresión de los pacientes, en ningún estudio se describen efectos adversos asociados al tratamiento.

d) Parámetros de función hepática: estudios clínicos realizados en humanos han demostrado como el uso de probióticos puede mejorar también la función hepática en los pacientes con cirrosis. Así, en uno de los estudios diseñados para ver el efecto de los probióticos sobre la encefalopatía hepática se confirmó como la administración de Synbiotic 2000 durante un mes mejoraba la puntuación Child-Pugh a expensas de mejoría en los niveles de albúmina y bilirrubina, así como del tiempo de protrombina [201]. Un segundo estudio realizado en 39 pacientes cirróticos mostró resultados similares tras la administración de *Escherichia coli* Nissle durante 42 días (tendencia a disminución de los niveles de endotoxina y mejoría en la puntuación Child-Pugh, si bien en este estudio los resultados no consiguieron significación estadística) [210]. Igualmente, en un ensayo clínico comentado previamente y dirigido a evaluar la eficacia de los probióticos en la prevención de encefalopatía hepática [205] se comprobó que su administración durante 6 meses mejoraba los parámetros de función hepática (disminución en la puntuación tanto de la clasificación Child Pugh como del modelo MELD).

Además de la utilidad que los preparados probióticos han demostrado en estos diferentes “escenarios” de la cirrosis hepática, varios estudios han demostrado la capacidad de productos probióticos / prebióticos para disminuir los niveles circulantes de endotoxina y TNF alfa a través de la disminución de la traslocación bacteriana, sugiriendo que el tratamiento con dichos compuestos podría mejorar el estado de circulación hiperdinámica en pacientes con cirrosis [201, 205, 210, 213, 214]. Teniendo en cuenta, como se ha comentado a lo largo de la introducción, la implicación que el estado de circulación hiperdinámica

tiene en el desarrollo de algunas de las manifestaciones clínicas más importantes de la cirrosis (como la ascitis o el síndrome hepatorenal) la mejoría de dicho estado mediante manipulación farmacológica podría ser un ambicioso objetivo terapéutico, pudiendo obtener grandes beneficios en el control de las complicaciones y de la progresión de la cirrosis hepática. Sin embargo, hasta el día de hoy son muy escasos estudios que han evaluado el efecto de los probióticos en los parámetros hemodinámicos de los pacientes con cirrosis e hipertensión portal.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

La hipótesis del presente trabajo es que la administración de un preparado probiótico en pacientes con cirrosis hepática y ascitis podría mejorar el estado circulatorio hiperdinámico y el síndrome de hipertensión portal característico de estos pacientes.

OBJETIVOS

Objetivo principal

Evaluar de forma prospectiva la influencia de la administración de un preparado probiótico sobre los parámetros hemodinámicos característicos de la hipertensión portal en la cirrosis.

Objetivos secundarios

1. Analizar la modificación en los niveles séricos de mediadores vasoactivos circulantes. Para ello se determinará la concentración de TNF α , productos derivados del ON (nitritos, nitratos, NOx), así como niveles séricos de IL-1 β e IL-6.
2. Analizar la modificación en parámetros de traslocación bacteriana mediante la determinación de niveles séricos de LBP y determinación de la presencia de DNA bacteriano en suero.
3. Analizar la evolución de los parámetros de función hepática: bilirrubina, albúmina, ALT, INR, sodio.
4. Analizar la seguridad de la administración de un preparado probiótico en pacientes con cirrosis descompensada y ascitis.

PACIENTES Y MÉTODOS

PACIENTES Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio piloto abierto, de inclusión prospectiva, de prueba de concepto, destinado a evaluar el efecto de la administración continuada de un preparado probiótico sobre el síndrome de hipertensión portal en pacientes con cirrosis hepática descompensada y ascitis.

SELECCIÓN DE PACIENTES

El periodo de reclutamiento y estudio de pacientes se prolongó durante 51 meses (desde marzo de 2007 a mayo de 2011). Para ello, se utilizaron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión:

1. Edad comprendida entre 18 y 75 años.
2. Diagnóstico de cirrosis hepática (de cualquier etiología) mediante biopsia hepática o mediante la combinación de criterios clínicos, radiológicos y biológicos confirmatorios e inequívocos del diagnóstico.
3. Evidencia de enfermedad hepática descompensada con puntuación de Child-Pugh entre 7 y 12 puntos.
4. Ascitis (la presencia únicamente de edemas en miembros inferiores o líquido libre intraabdominal en la ecografía sin objetivar ascitis en el examen físico no se consideró criterio de inclusión).
5. Presencia de hipertensión portal sinusoidal grave, definida por un GPVH mayor de 12 mmHg, determinado mediante la realización de un estudio hemodinámico.

Criterios de exclusión:

1. Abstinencia alcohólica inferior a 6 meses.
2. Mujeres en periodo de gestación o lactancia.
3. Infección concomitante por el virus de la inmunodeficiencia humana u otras inmunodeficiencias asociadas.
4. Necesidad de manipulación farmacológica en las 6 semanas previas a la inclusión, incluyendo:
 - a) Administración de lactulosa o lactitol.
 - b) Administración de antibióticos.
 - c) Inicio de tratamiento con betabloqueantes no cardiosselectivos
5. Pacientes con insuficiencia hepática reagudizada.
6. Existencia de trombosis portal.
7. Existencia de carcinoma hepatocelular (nódulo único mayor de 5 cm o CHC multinodular) objetivado en prueba de imagen (ecografía, TC abdominal, RMN abdominal).
8. Portadores de derivación porto-sistémica percutánea o quirúrgica.
9. Participación simultánea en algún otro estudio de investigación o ensayo clínico.
10. Incapacidad para, o negativa a firmar el consentimiento informado.

INTERVENCIÓN

Para la realización del estudio se administró un preparado probiótico con una alta concentración de bacterias ácido lácticas, comercializado con el nombre de VSL#3® (FAES FARMA, Madrid, España), compuesto por una mezcla liofilizada que contiene una alta concentración de lactobacilos (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, y *Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus*), bifidobacterias (*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, y *Bifidobacterium infantis*) y *Streptococcus salivarius subspecies thermophilus* (450 billones de colonias por sobre). Dichas cepas bacterianas forman parte de la microflora humana habitual.

El preparado probiótico se administró durante 6 semanas a la dosis de 2 sobres al día por vía oral.

Esquema de seguimiento y exploraciones complementarias

El seguimiento de los pacientes incluidos en el estudio se realizó en el Hospital de Día de la Unidad de Hepatología y Trasplante Hepático del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, estableciendo el siguiente régimen de visitas y exploraciones complementarias:

Evaluación inicial o visita 0

En la evaluación inicial se sometieron a evaluación todos los posibles candidatos a inclusión en el estudio mediante la realización de las siguientes exploraciones complementarias:

- a) Historia clínica y exploración física completa.
- b) Realización de análisis hematológicos y bioquímicos.
- c) Determinación de serología de VIH.
- d) Test de embarazo en el caso de mujeres en edad fértil.
- e) Cuantificación de inmunoglobulinas y complemento, estudio de subpoblaciones linfocitarias.
- f) Realización de ecografía abdominal.
- g) Realización de endoscopia digestiva superior en caso de indicación clínica para diagnóstico de varices esófago-gástricas, siguiendo las recomendaciones establecidas en la conferencia de consenso Baveno V [215]: cada 2 ó 3 años en pacientes sin antecedente de varices esófago-gástricas, cada 1 ó 2 años en pacientes con varices pequeñas en los que se ha decidido no iniciar tratamiento betabloqueante, o ante cualquier descompensación clínica o aparición de nuevos signos de hipertensión portal.
- h) En los pacientes elegibles que cumplieran criterios de inclusión se realizó un estudio hemodinámico con medición del GPVH así como cateterización cardiopulmonar derecha para la medición de las resistencias vasculares sistémicas, la presión arterial media y el gasto cardiaco (la realización del estudio hemodinámico forma parte de la evaluación rutinaria para trasplante hepático en nuestro

centro). Durante la realización del estudio hemodinámico se realizó extracción de muestras sanguíneas para su procesamiento y congelación.

Tras completar las exploraciones complementarias se identificaron los pacientes que cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, realizando entrevista para informar sobre el estudio, ofreciendo su participación y entregando el consentimiento informado para su lectura y comprensión. En los casos en los que el paciente finalmente aceptó participar en el estudio, el consentimiento informado fue recogido, una vez firmado, antes de iniciar la visita 1.

Visitas 1, 2 y 3

Las visitas 1, 2 y 3 estuvieron separadas por un intervalo de 15 días entre ellas.

En cada una de estas visitas se proporcionó la medicación correspondiente al siguiente intervalo de administración (15 días) y se realizaron unas exploraciones complementarias básicas:

- a) Historia clínica y exploración física.
- b) Análisis básico (incluye hemograma, bioquímica completa y coagulación).

Estas visitas se diseñaron para seguimiento de la adherencia al tratamiento, así como vigilar posibles efectos adversos asociados al mismo, por lo que se permitía la posibilidad de acortar el intervalo entre visitas en caso de requerimiento por parte del paciente.

Evaluación final o visita 4

La evaluación final se realizó dos semanas después de la visita 3, al finalizar el periodo de administración del producto probiótico fijado en 6

semanas. En esta última visita se llevaron a cabo las siguientes exploraciones complementarias:

- a) Historia clínica y exploración física.
- b) Análisis básico.
- c) Segundo estudio hemodinámico idéntico al estudio hemodinámico inicial, con recogida de muestras sanguíneas para su procesado y congelación.

METODOLOGÍA DE LA EVALUACIÓN

Estudios hemodinámicos

Los estudios hemodinámicos se realizaron a todos los pacientes antes de comenzar y al terminar la administración del producto probiótico, respectivamente (con un margen de ± 15 días, prolongando la administración del preparado probiótico más allá de las 6 semanas, hasta la realización del segundo estudio hemodinámico, en caso de que fuera necesario). Todos los estudios se realizaron por la mañana, tras 8 horas de ayuno y bajo sedación con midazolam en los casos en los que fue necesario (0.02 mg/kg i.v.), cuya ausencia de efecto sobre la presión portal se ha comprobado [72]. Antes de cada estudio se calibró el transductor de presión de acuerdo al procedimiento habitual del Laboratorio de Hemodinámica Hepática, situando el valor de referencia *cero* a la altura de la línea medio-axilar, es decir, de la aurícula derecha. Se registraron basalmente y cada 5 minutos durante todo el estudio la presión arterial y la frecuencia cardíaca mediante un esfigmomanómetro (Dinamap, Critikon Inc., Tampa, FL). Con el paciente en decúbito supino, bajo anestesia local y tras colocar según la técnica de Seldinger un catéter-introductor de 8F (Medikit Co Ltd. Tokio, Japón) en la vena yugular interna derecha, se introdujo bajo control fluoroscópico un catéter tipo Swan-Ganz de 7F (Edwards Lifesciences Corp., Irvine, USA) hasta la arteria pulmonar derecha, para medir la presión en la aurícula derecha, la presión en la arteria pulmonar, la presión enclavada pulmonar tras el inflado del balón distal (presión capilar pulmonar) y el gasto cardíaco por el método de termodilución [216]. La resistencia vascular periférica sistémica fue calculada según la fórmula $RVS=80(PAM-PAD)/GC$,

donde PAM es la presión arterial media, PAD la presión en la aurícula derecha y GC el gasto cardiaco. El índice cardiaco fue calculado mediante la fórmula $CO / \text{área de superficie corporal}$. Tras retirar el catéter Swan-Ganz, se introdujo un catéter-balón de 7F (Medi-Tech, Boston Scientific Cork Ltd, Cork, Irlanda) hasta una vena suprahepática (habitualmente la derecha). Este catéter permite medir el gradiente de presión venosa hepática, equivalente al gradiente porto-cava. Dicho gradiente se calcula obtenido como la diferencia entre la presión suprahepática enclavada (PSHE, equivalente a la presión portal, tras inflar del balón distal) y la presión suprahepática libre (PSHL, con el balón desinflado, equivalente a la presión en la vena cava inferior). Los estudios se realizaron según el procedimiento previamente descrito [217]. La PSHE se midió tras comprobar el adecuado enclavamiento del catéter-balón mediante la ausencia de reflujo hacia la vena cava inferior (VCI) al inyectar 2 mililitros de contraste; se registró el valor de la PSHE durante al menos un minuto, o hasta su estabilización. La medición de la PSHL se hizo con el extremo distal del catéter introducido a menos de 5 centímetros de la unión entre la vena suprahepática y la VCI, durante 15 segundos. El valor normal del GPVH oscila entre 1 y 5 mm Hg. Todas las medidas hemodinámicas se registraron por triplicado en formato digital a través de un sistema multicanal, para su análisis posterior (Power-Lab 45, AD Instrument, Chalgrove, UK). Tras realizar las mediciones de PSHL y PSHE, se midió la presión en la VCI a la altura de la desembocadura de las venas suprahepáticas durante 15 segundos. En aquellos casos en que la diferencia entre la PSHL y la presión en la VCI fue mayor de 1 mm Hg, se utilizó la segunda para el cálculo del gradiente porto-cava. Para maximizar la fiabilidad de las mediciones, se fotografió en el estudio basal la vena utilizada, con el objeto de realizar el segundo estudio en la misma vena y posición que la inicial. Durante el procedimiento se obtuvieron 40 ml de sangre de vena periférica y 40 ml procedentes de la vena suprahepática para las determinaciones de laboratorio. Todos los registros fueron impresos en papel para su interpretación por un único investigador de manera ciega, sin conocimiento de la cronología del estudio ni de la identidad del paciente. Todas las muestras para archivo fueron procesadas del mismo modo: centrifugación (4000 g durante 20 minutos a 4°C) para separación de plasma, que posteriormente se almacenó a -70°C en crioviales (Nunc, Rochester, NY) conteniendo alícuotas de 1.5 ml cada uno,

hasta su análisis.

Determinaciones analíticas

Las determinaciones analíticas básicas, que se realizan de manera rutinaria en la práctica habitual (hemograma, bioquímica completa, coagulación, cuantificación de inmunoglobulinas y complemento, estudio de subpoblaciones linfocitarias, serología para VHB, VHC y VIH) se realizaron en los laboratorios de bioquímica e inmunología de nuestro centro, mediante técnica comercial estándar.

Medición de productos derivados del óxido nítrico

Para la medición de los niveles séricos de nitritos, nitratos y la suma de ambos (NOx), productos derivados de óxido nítrico, se utilizó un kit comercial ELISA comercializado por R&D Systems (Minneapolis, MN, EE.UU).

Determinación de la proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP) y citoquinas

Para la medición de LBP y citoquinas se obtuvieron muestras de sangre periférica en la visita inicial (visita 0) y en la evaluación final (visita 4). Mediante kits comerciales ELISA se determinó la concentración plasmática de TNF α y de interleucina (IL)-1 β (BioSource International, Nivelles, Bélgica), IL-6 (BD Bioscience, Cat # 555220) y LBP (HK315, HyCult Biotech, Uden, Países Bajos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El límite inferior de detección para TNF α fue 12 pg / ml, para IL-1 β fue 15,6 pg / ml, para IL-6 fue 9,4 pg / ml, y para LBP fue 6,6 ng / ml.

Detección de DNA bacteriano

Una muestra de sangre periférica obtenida durante la realización de los estudios hemodinámicos inicial y final fue inoculada en tubos de caucho sellados libres de pirógenos (Endo tubo ET, Chromogenix AB, Molndal, Suecia), posteriormente centrifugados a 2000 g durante 10 minutos y almacenados a -20°C. Las muestras fueron procesadas en cámaras de flujo de aire, sin exposición al aire libre. La detección de DNA bacteriano se realizó por el método previamente descrito en la literatura [123] en la Unidad de Hepatología del Hospital General Universitario de Alicante por el grupo de Dr. Such, con demostrada experiencia en el campo de la traslocación bacteriana y en la determinación de DNA bacteriano en la cirrosis hepática. De forma resumida, 200 µl de suero fueron incubados en un tampón de proteinasa K lisozima durante 2 horas, colocándolo posteriormente en columnas de centrifugación QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania). Una reacción en cadena de la polimerasa de amplio rango para la región conservada del 16S gen procariota ARN ribosomal se llevó a cabo utilizando los siguientes cebadores universales: AGAGTTTGATCATGGCTCAG-30 y 50 -ACCGC GACTGCTGCTGGCAC-30. El volumen total de la reacción en cadena de la polimerasa fue filtrado en columnas de centrifugación QIAquick (Qiagen) antes de la secuenciación de nucleótidos con el kit ABI Prisma Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v2.0 y el secuenciador automatizado ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La identificación de las secuencias se llevó a cabo mediante la técnica BLAST en el Centro Nacional de Información sobre Biotecnología ([www. Ncbi.nlm.nih.gov](http://www.Ncbi.nlm.nih.gov)). Los detalles técnicos del método, incluyendo exactitud, precisión, linealidad y reproducibilidad son los mismos descritos previamente en otros estudios.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó el programa informático SPSS (versión 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU).

Los resultados del estudio se presentan como:

1. Variables continuas:
 - a. media (\pm desviación estándar) en el caso de variables paramétricas.
 - b. mediana (rango) en el caso de variables no paramétricas.
2. Variables categóricas, frecuencia (%).

La normalidad fue evaluada mediante el test de Kolmogorov - Smirnov. Para las comparaciones entre los valores obtenidos de las diferentes variables antes y después de la administración del preparado probiótico se utilizó el test de la *t* de Student para datos pareados. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo [218].

Aprobación del estudio

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Ensayos Clínicos del Hospital, y todos los pacientes entregaron firmado un documento de consentimiento informado antes de ser incluidos en el estudio.

RESULTADOS

RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio 17 pacientes; todos ellos, como se ha comentado previamente, cumplían los criterios de inclusión. Todos los pacientes incluidos se sometieron a la evaluación inicial (tal y como se ha detallado) e iniciaron la toma de VSL#3 (dos sobres al día) como suplemento a su tratamiento habitual.

De los 17 pacientes, 5 finalizaron prematuramente la toma de VSL#3, por diversas razones: un paciente con varices esofágicas grandes (en profilaxis primaria con nadolol) presentó un episodio de hemorragia digestiva alta secundaria a varices esofágicas a los 25 días del inicio del estudio; la hemorragia fue tratada con éxito mediante tratamiento farmacológico convencional y ligadura endoscópica. Otro paciente presentó un episodio de celulitis aguda en la pierna en el día 12 de la administración, tratado con antibioterapia en régimen de hospitalización, sin complicaciones. Un tercer paciente refirió dispepsia leve atribuida a la toma del preparado probiótico VSL#3, suspendiendo el tratamiento en el día 10. Por último, otros dos pacientes (sin presentar efectos secundarios ni eventos clínicamente relevantes durante el periodo de administración de VSL#3) finalizaron prematuramente su participación al no aceptar un segundo estudio hemodinámico, retirando el consentimiento.

Características de los pacientes

Un total de 12 pacientes componen la población final de estudio. El tiempo medio de administración del preparado probiótico VSL#3 fue 45 (42-48) días. Las características basales epidemiológicas y en relación con su enfermedad hepática se resumen en la tabla 2.

	Pacientes (n=12)
Sexo masculino	11 (91.6%)
Edad	55 (43-60)
Etiología <ul style="list-style-type: none"> • Alcohol • Hepatitis crónica VHC • Alcohol + hepatitis crónica VHC • EHNA 	7 (58.3%) 2 (16.6%) 2 (16.6%) 1 (8.5%)
Varices <ul style="list-style-type: none"> • No • Pequeñas • Grandes 	2 (16.6%) 8 (66.8%) 2 (16.6%)
Encefalopatía previa	3 (25%)
Ascitis <ul style="list-style-type: none"> • Controlada con diuréticos • Mal controlada / refractaria a diuréticos 	9 (75%) 3 (25%)
Puntuación Child Pugh	9 (7-13)
Clasificación Child Pugh <ul style="list-style-type: none"> • B (7-9 puntos) • C (≥ 10 puntos) 	6 (50%) 6 (50%)
Puntuación MELD	13 (7-26)
Puntuación MELD-sodio	17 (9-28)
Hemoglobina ($\times 10^6 / \mu\text{L}$)	11.8 (8.7-16.6)
Leucocitos ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	5050 (3000-10300)
Plaquetas ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	84000 (52000-222000)
Bilirrubina (mg/dL)	2.5 (0.8-12.1)
Albúmina (g/dL)	3.6 (2.2-4.5)
INR	1.3 (1.0-2.4)
ALT (U/L)	31 (9-87)
Creatinina (mg/dL)	0.74 (0.50-1.10)
Urea (mg/dL)	34 (14-48)
Sodio (mEq/L)	136 (127-140)

MELD: modelo para enfermedad hepática terminal; INR: ratio internacional normalizada

Tabla 2: características basales de la población final de estudio

Ninguno de los pacientes que el estudio tenía historia previa de hemorragia por varices esofágicas. Sólo dos pacientes tenían varices esofágicas grandes, ambos estaban en tratamiento farmacológico con propranolol como profilaxis primaria de hemorragia varicosa (80 y 100 mg al día, respectivamente), sin modificación de la dosis durante el periodo de la administración de VSL#3 (un tercer paciente en profilaxis primaria con nadolol abandonó el estudio prematuramente por episodio de hemorragia digestiva varicosa, tal y como se ha comentado previamente). Ningún paciente recibió

otra droga vasoactiva durante el estudio. De la población final incluida en el estudio, 9 pacientes tenían ascitis bien controlada con espironolactona [100 (100-200) mg/día]; 6 de éstos recibían además tratamiento con furosemida [40 (40-80) mg/día] para control de la ascitis. Los otros tres pacientes tenían ascitis de difícil control a pesar del tratamiento diurético, precisando la realización de paracentesis evacuadora de forma periódica. Ningún paciente había sufrido un episodio previo de peritonitis bacteriana espontánea. Los niveles de GGT no se modificaron durante el periodo de estudio (cifra basal: 65.5 [31-191] U/L; cifra final: 65.5 [31-189] U/L) lo que sugiere cumplimiento de abstinencia del consumo de alcohol referida por los pacientes.

Modificación de los parámetros hemodinámicos hepáticos tras la administración de VSL#3.

Todos los pacientes que finalizaron la suplementación con VSL#3 durante 6 semanas se sometieron a un segundo estudio hemodinámico, observando una disminución en el GPVH desde 21.8 ± 6.2 mmHg (valor medio basal) a 19.6 ± 6.2 mmHg al finalizar el estudio, lo que supone una reducción media del $10.8 (\pm 8.9)\%$ ($P = 0.001$). Es de interés destacar que 8 de los 12 pacientes (67%) consiguieron tras la suplementación con VSL#3 una disminución del GPVH superior al 10% respecto al valor basal. Un paciente mostró una reducción del GPVH inferior al 10%, mientras que en otros 3 pacientes (25%) el GPVH no se modificó tras la administración de VSL#3. En la figura 1 se resume, de forma individual y global, la evolución del GPVH tras la administración del preparado probiótico.

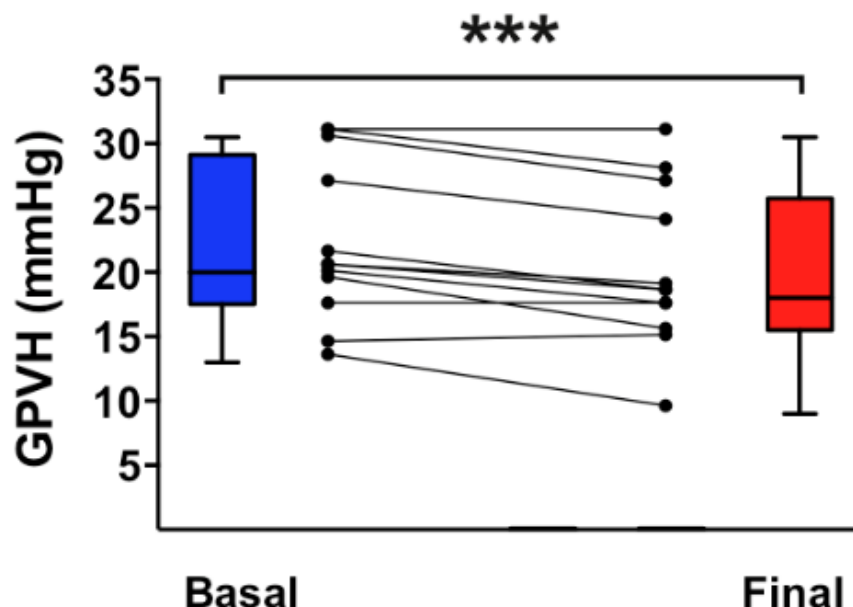


Figura 1: evolución global e individual del gradiente de presión venosa hepática (GPVH) tras la administración de VSL#3. *** $P < 0.001$

Por otra parte, se ha evaluado la modificación del GPVH tras la suplementación con el preparado probiótico VSL#3 en función de determinadas variables de los pacientes sin observar diferencias estadísticamente significativas: la reducción del GPVH tras la administración de VSL#3 fue independiente de la presencia o ausencia de varices esofágicas ($P = 0.245$), al igual que fue independiente de la clasificación de Child Pugh ($P = 0.561$).

Modificación de los parámetros hemodinámicos sistémicos tras la administración de VSL#3.

Tras la administración de VSL#3 durante 6 semanas se objetivó una reducción significativa en el índice cardiaco (desde cifra basal de 4.6 ± 1.6 a 4.2 ± 1.5 L/min/m² al finalizar el estudio, $P = 0.004$). Igualmente se comprobó una disminución de la frecuencia cardiaca, desde 83 ± 18 lpm (cifra basal) a 75 ± 17 lpm al finalizar el estudio ($P = 0.001$), un aumento significativo en la RVS desde 803 ± 272 a 912 ± 338 dina x seg x cm⁻⁵ ($P = 0.016$), así como una tendencia al incremento de la PAM (82.9 ± 6.9 vs. 87.9 ± 10.1 mmHg, $P = 0.064$). En la figura 2 se resume la evolución de los parámetros hemodinámicos sistémicos.

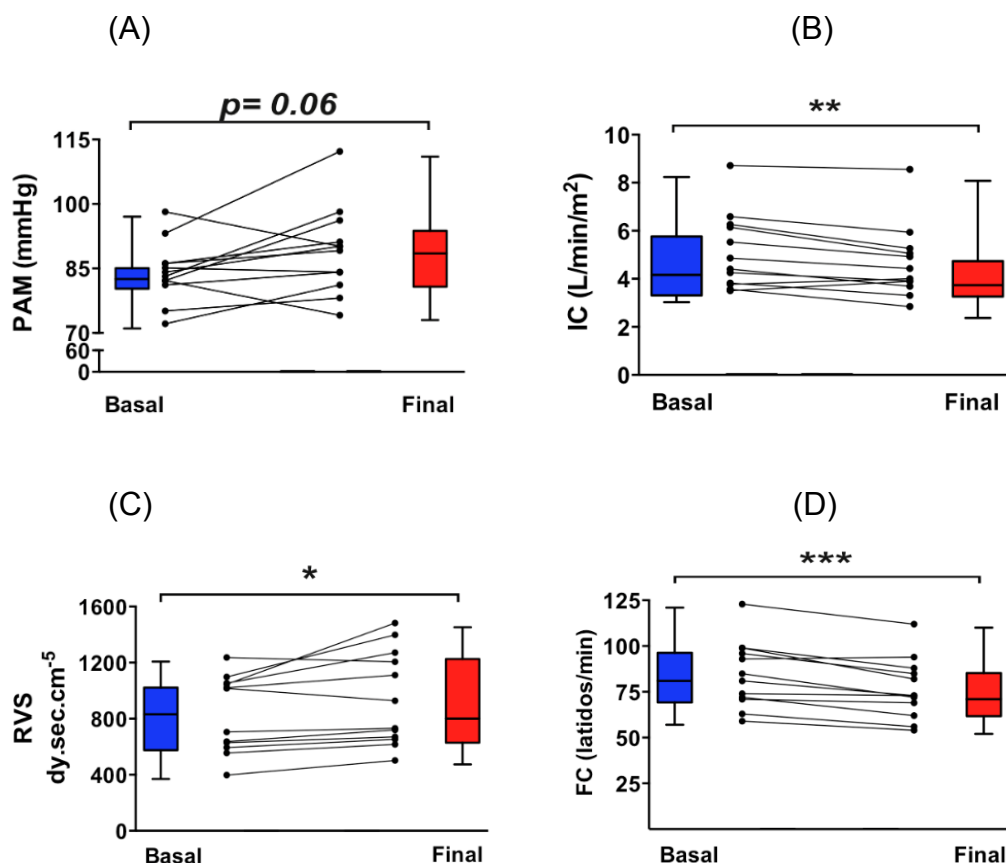


Figura 2: evolución global e individual de los cambios en la presión arterial media PAM (A), en el índice cardíaco IC (B), en la resistencia vascular sistémica RVS (C) y en la frecuencia cardíaca FC (D) tras la administración de VSL#3. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

La administración de VSL#3, sin embargo, no se acompañó de cambios significativos en la presión de la arteria pulmonar (14.4 ± 6.2 vs. 14.5 ± 4.9 mmHg, $P = 0.9$), en la presión capilar pulmonar (8.4 ± 5.4 vs. 7.7 ± 3.5 mmHg, $P = 0.6$) o en la presión en la aurícula derecha (4.5 ± 2.2 vs. 4.6 ± 2.4 mmHg, $P = 0.9$).

	Antes de la administración de VSL#3	Al final de la administración de VSL#3	
GPVH (mmHg)	21.8 ± 6.2	19.6 ± 6.2	<i>P</i> = 0.001
IC (L/min/m ²)	4.6 ± 1.6	4.2 ± 1.5	<i>P</i> = 0.004
FC (lpm)	83 ± 18	75 ± 17	<i>P</i> = 0.001
RVS (dina x seg x cm ⁻⁵)	803 ± 272	912 ± 338	<i>P</i> = 0.016
PAM (mmHg)	82.9 ± 6.9	87.9 ± 10.1	<i>P</i> = 0.064
PAP (mmHg)	14.4 ± 6.2	14.5 ± 4.9	<i>P</i> = 0.9
PCP (mmHg)	8.4 ± 5.4	7.7 ± 3.5	<i>P</i> = 0.6
PAD (mmHg)	4.5 ± 2.2	4.6 ± 2.4	<i>P</i> = 0.9

Tabla 3: resumen de la evolución de los parámetros hemodinámicos esplácnicos y sistémicos con la administración de VSL#3. GPVH: gradiente de presión venosa hepática; IC: índice cardíaco; FC: frecuencia cardíaca; RVS: resistencia vascular sistémica; PAM: presión arterial media; PAP: presión arteria pulmonar; PCP: presión capilar pulmonar; PAD: presión en aurícula derecha.

Modificación en los niveles de sodio sérico tras la administración de VSL#3.

Tras la administración de VSL#3 se objetivó un aumento significativo en el nivel de sodio en suero, desde 135.1 ± 3.8 mEq/L (valor basal) a 138.0 ± 3.1 mEq/L al finalizar el estudio (*P* = 0.009). Este cambio en el valor de sodio sérico no se acompañó de modificación en los niveles de creatinina y urea. Tampoco se realizaron modificaciones en la pauta de diuréticos de los pacientes del estudio que pudieran justificar esta modificación. En la figura 3 se resume, de forma individual y global, la evolución de sodio sérico tras la administración de probióticos.

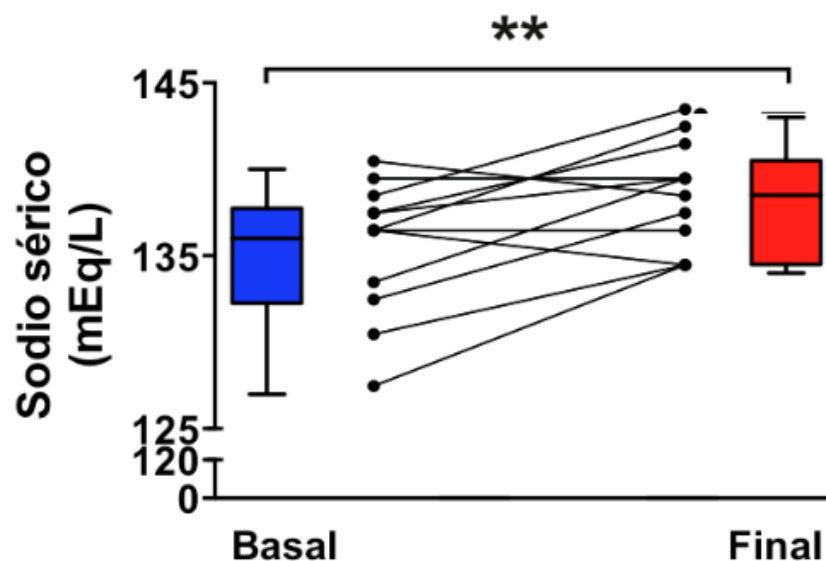


Figura 3: Evolución global e individual en los niveles de sodio sérico tras la administración de VSL#3. ** $P < 0.01$

Es interesante destacar que el sodio sérico aumentó en 8 de los 12 pacientes incluidos en el estudio. Dos pacientes que inicialmente presentaban hiponatremia, prácticamente normalizaron los valores (desde 127 y 130 mEq/L, respectivamente, a 134 mEq/L). Otros dos pacientes con hiponatremia relativa también normalizaron el sodio sérico al final del estudio (desde 132 mEq/L a 137 mEq/L, y desde 133 mEq/L a 139 mEq/L). Ningún paciente con niveles de sodio normal en el control analítico inicial desarrolló hiponatremia durante el estudio.

Modificación en parámetros de traslocación bacteriana tras la administración de VSL#3.

La influencia de la administración de probióticos sobre el fenómeno de traslocación bacteriana ha sido evaluada en nuestro estudio mediante la determinación de niveles circulantes de DNA bacteriano y de LBP (mediante las técnicas descritas previamente).

Respecto a la detección de DNA bacteriano en sangre periférica, sólo 3 pacientes de los 12 incluidos en el estudio (25%) presentaron niveles detectables de DNA bacteriano en la muestra de sangre basal (extraída antes de iniciar la administración de VSL#3), con detección de un microorganismo

diferente en cada uno de los tres pacientes (*Shigella flexneri*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*). Tras la suplementación con VSL#3 durante 6 semanas, la detección de DNA bacteriano fue negativa en 2 de estos 3 pacientes, mientras que en el tercero continuó aislándose fragmentos de DNA bacteriano en la muestra de sangre, si bien por un microorganismo diferente al objetivado en la muestra de sangre basal (inicialmente se aisló *Shigella flexneri*, mientras que al final del estudio se aisló *Klebsiella pneumoniae*). Por último, uno de los 9 pacientes con DNA bacteriano indetectable en la muestra de sangre basal mostró, en la muestra de sangre final, presencia de DNA bacteriano de *Escherichia coli*. En la tabla 4 se resumen los aislamientos microbiológicos identificados en nuestra población de estudio.

Paciente	DNA bacteriano circulante	
	Basal	Final del tratamiento
1	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	-----	-----
3	-----	<i>Escherichia coli</i>
4	-----	-----
5	-----	-----
6	<i>Serratia marcescens</i>	-----
7	-----	-----
8	-----	-----
9	-----	-----
10	-----	-----
11	<i>Escherichia coli</i>	-----
12	-----	-----

Tabla 4: caracterización microbiológica de los pacientes, basada en la detección de DNA bacteriano en muestra sanguínea.

Respecto a la determinación de los niveles plasmáticos de LBP como marcador de traslocación bacteriana, en nuestro estudio no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles séricos de LBP al inicio del estudio y al final de suplementación con VSL#3 [32.0 (13.7-38.4) µg/ml vs. 23.1 (13.1-39.4) µg/ml, $P= 0.24$].

Modificación de parámetros de respuesta inflamatoria sistémica tras la administración de VSL#3.

Como marcadores para determinar cambios en respuesta inflamatoria sistémica tras la administración de VSL#3, se determinaron niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6, TNF-α), sin encontrar cambios significativos. En ningún paciente se detectaron niveles plasmáticos de IL-1β, ni

antes ni después de la administración de VSL#3. Sólo dos pacientes mostraron niveles detectables de TNF- α en la muestra de sangre basal; en uno de ellos no se detectaron niveles de TNF- α tras finalizar la suplementación (desde nivel basal de 101 pg/ml a no detectable), mientras que en el segundo paciente se objetivó una disminución en los niveles de TNF- α (desde 198 a 134 pg/ml) tras la administración de VSL#3. Por último, los niveles plasmáticos de IL-6 disminuyeron, tras la suplementación con VSL#3, en 7 de los 12 pacientes, si bien esta disminución no fue estadísticamente significativa [89 (15-283) pg/ml vs. 69.5 (14-102) pg/ml, $P= 0.16$]. Estos resultados se muestran en la figura 4.

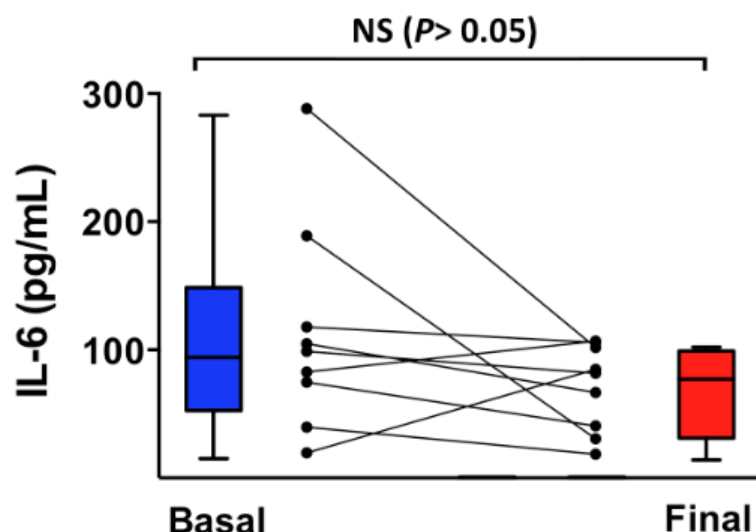


Figura 4: Evolución global e individual de los niveles de IL-6 tras la administración de VSL#3.

Igualmente se evaluaron en nuestro estudio cambios en niveles circulantes de productos derivados del ON (nitratos, nitritos, NOx) tras la administración de VSL#3, como marcadores del metabolismo del ON, sin obtener resultados relevantes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de nitratos [146 (75-262) pmol/ml vs. 173 (116-220) pmol/ml, $P=0.3$], nitritos [68 (44-83) pmol/ml vs. 76 (47-88) pmol/ml, $P= 0.3$] y NOx [209 (148-324) pmol/ml vs. 250 (163-308) pmol/ml, $P= 0.1$].

Modificación en los parámetros de función hepática tras la administración de VSL#3.

Tras la administración de VSL#3 durante 6 semanas en pacientes con cirrosis y ascitis no hubo variación estadísticamente significativa en la puntuación de Child Pugh (9.2 ± 1.9 vs. 8.9 ± 1.7 , $P= 0.5$) ni en la puntuación MELD (14.5 ± 5.6 vs. 14.5 ± 6.6 , $P= 0.987$) que sugieran beneficio o perjuicio de la administración de VSL#3 sobre la función hepática.

Seguridad de la administración de VSL#3 en pacientes cirróticos con ascitis.

Durante el periodo de estudio y administración de VSL#3 no se observó, en ninguno de los 12 pacientes que completaron el mismo, ningún efecto adverso grave ni ninguna nueva descompensación de su enfermedad hepática (no se registró ningún episodio de encefalopatía hepática ni peritonitis bacteriana espontánea) atribuible a la administración del preparado probiótico. No obstante, dos pacientes abandonaron prematuramente el estudio por episodio de hemorragia digestiva varicosa e infección activa (ambos episodios se atribuyeron a progresión de la enfermedad hepática, tal y como comentaremos posteriormente).

De igual forma, durante el periodo de estudio tampoco se produjeron cambios en la dosis de diuréticos (como se ha comentado previamente) ni en la periodicidad de paracentesis evacuadoras, asumiendo de este modo una estabilidad de la ascitis durante la administración del preparado probiótico. Por último, es de destacar que no se aisló DNA bacteriano perteneciente a cepas que forman parte del probiótico VSL#3 en las muestras sanguíneas obtenidas de los pacientes durante el estudio.

Respecto a la supervivencia, un año después de la finalización del estudio 11 pacientes continuaban vivos; 4 se habían sometido a un trasplante hepático con éxito, mientras que los otros 7 mantenían estabilidad de la enfermedad hepática. Sólo un paciente falleció durante el primer año tras la finalización del estudio, como consecuencia de la enfermedad hepática avanzada, estando en lista de espera para trasplante hepático.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La base racional para el uso de preparados probióticos en la cirrosis hepática se encuentra en su capacidad para modular la flora bacteriana intestinal y ejercer efectos beneficiosos sobre la barrera intestinal, aspectos claves en el proceso de traslocación bacteriana [191]. Este fenómeno, tiene un papel fundamental en la fisiopatología de la hipertensión portal y del estado de circulación hiperdinámica característico de los pacientes con cirrosis avanzada, al inducir un estado de respuesta inflamatoria crónica con liberación de citoquinas proinflamatorias y óxido nítrico, que favorecen la vasodilatación esplácnica y sistémica agravando el estado de circulación hiperdinámica. Los estudios clínicos realizados con probióticos en pacientes con cirrosis hepática, si bien escasos, se han centrado en valorar su utilidad en la prevención de infecciones [208,209], así como en el manejo de la encefalopatía hepática [196, 198-202].

Los resultados del presente estudio sugieren que la administración de un preparado probiótico (VSL#3) durante 6 semanas en pacientes con cirrosis descompensada y ascitis, mejora no sólo el grado de hipertensión portal (expresado como disminución del GPVH) sino también el estado de circulación hiperdinámica (reflejado en la mejoría de parámetros como la PAM, el GC, el IC y la RVS).

Efecto de la administración de VSL#3 sobre el GPVH

Como primer hallazgo relevante en nuestro estudio debemos señalar que la administración de VSL#3 durante 6 semanas disminuyó el GPVH un 10.8%, consiguiendo un descenso mayor del 10% en el 67% de los pacientes. Esta reducción ha sido considerada en diversos estudios como una reducción clínicamente relevante en la historia natural de cirrosis hepática. Así, en un ensayo clínico publicado en 2005 dirigido a evaluar la efectividad de la administración de betabloqueantes (timolol) en la prevención primaria del desarrollo de varices esofágicas [219], se describe una menor incidencia de varices esofágicas en los pacientes con disminución del GVPH $\geq 10\%$

(independientemente del grupo asignado al paciente), disminución similar a la objetivada en nuestro estudio. De igual forma, otros estudios publicados en la literatura han definido como respuesta hemodinámica una disminución del GPVH superior al 10% [76]. Por otra parte, el tratamiento actualmente disponible (betabloqueantes \pm nitratos) consigue respuesta hemodinámica (definida como disminución del GPVH $> 20\%$) en menos del 50% de los pacientes [88, 220, 221]; de hecho, diversos estudios clínicos realizados para ver la eficacia del propranolol consideran como respuesta hemodinámica clínicamente relevante una disminución del GPVH mayor del 10% [222, 223]. Por último, un reciente estudio publicado posteriormente al diseño del nuestro ha evaluado la eficacia de los preparados probióticos asociados al tratamiento habitual con betabloqueantes para disminuir el GPVH en pacientes con cirrosis, observando en el grupo tratado con betabloqueantes y placebo (tratamiento habitual en la práctica clínica) una disminución del GPVH del 11 %, similar a los resultados obtenidos en nuestro estudio [224].

La importancia clínica del resultado obtenido en nuestro estudio está avalada en la literatura por la publicación de varios meta-análisis donde se ha demostrado como el descenso del GPVH disminuye la mortalidad asociada a la cirrosis hepática de forma estadísticamente significativa [86, 87].

Por otra parte, en ningún paciente incluido en el estudio se observó un aumento del GPVH. No obstante, este hallazgo resulta esperable teniendo en cuenta que el intervalo de tiempo entre ambos estudios hemodinámicos fue únicamente 6 semanas.

Si bien es cierto que la ausencia de grupo control puede ser un inconveniente a la hora de analizar nuestros resultados, la decisión de no incluir en el estudio un grupo control vino determinada por el carácter invasivo del estudio hemodinámico (prueba necesaria para la determinación del GPVH), siendo cuestionable desde el punto de vista ético su repetición en un grupo de pacientes a los que no se administraría tratamiento alguno. No obstante, incluso con ausencia de grupo control que fortalezca los resultados, es poco esperable que un descenso espontáneo del GPVH (no influido por la administración de VSL#3) sea responsable de los resultados obtenidos por nuestro grupo. Así, un estudio clínico publicado previamente con mediciones repetidas del GPVH en un

intervalo de tiempo de 4 semanas (similar al nuestro), no observó disminución espontánea significativa del GPVH (19.8 ± 3.8 vs. 19.5 ± 4.4) [220].

Por otra parte, al analizar la historia natural de la hipertensión portal con los datos disponibles de nuestro centro no objetivamos tampoco disminución espontánea del GPVH. En una cohorte histórica de 30 pacientes con cirrosis compensada por hepatitis crónica C (grado de fibrosis F3-F4 según sistema de clasificación METAVIR) e hipertensión portal (GPVH > 5 mmHg) sometidos a dos estudios hemodinámicos con un intervalo de tiempo que oscila entre 12 y 36 meses (en ausencia de tratamiento antiviral o betabloqueante) una disminución del GPVH $\geq 10\%$ fue observada únicamente en dos de ellos (6.6%).

También con el objetivo de analizar la importancia clínica del resultado obtenido, se han revisado los datos sobre el efecto de la descontaminación intestinal sobre el GPVH. Respecto al efecto del norfloxacin, un estudio publicado en el año 2003 y realizado sobre una población de 37 pacientes similares a la nuestra (cirrosis y ascitis) no objetivó descenso en el GPVH tras la administración de norfloxacin (400 mg, dos veces al día, durante un mes), pese a disminuir los niveles de LBP como dato de acción sobre el fenómeno de traslocación bacteriana [51]. Sin embargo, otro estudio publicado en el mismo año y realizado en 14 pacientes demostró no sólo una disminución estadísticamente significativa de los niveles séricos de endotoxina tras la administración de norfloxacin durante un mes, sino también una tendencia a la disminución del GPVH [153]. Si bien esta disminución no fue estadísticamente significativa, la medición del GPVH se realizó únicamente sobre 10 pacientes, 6 de los cuales no tenían hipertensión portal clínicamente significativa (≥ 10 mmHg), por lo que podríamos esperar cambios más relevantes en caso de haber aumentado el tamaño muestral o haber modificado las características de los pacientes incluidos. Particularmente relevante es un reciente estudio que ha evaluado la utilidad de la rifaximina (utilizada en la práctica clínica para prevención de la encefalopatía hepática) para la descontaminación intestinal y modificación de la hipertensión portal. Sobre una población de 30 pacientes tratados durante un mes con rifaximina (1200 mg/día) se objetivó una disminución estadísticamente significativa no sólo de los niveles séricos de endotoxina sino también del GPVH, consiguiendo una reducción del GPVH en el

82% de los pacientes (cifras similares a nuestro estudio), con un descenso medio del GPVH del 19,57% [225].

Los estudios sobre la utilidad de preparados probióticos para modificar la hipertensión portal publicados hasta ahora muestran, sin embargo, resultados contradictorios respecto a los obtenidos por el nuestro. Un primer estudio piloto no controlado publicado en 2009 evaluó el efecto de los probióticos sobre el GPVH en una población de sólo pacientes cirróticos compensados o mínimamente descompensados, sin observar descenso del GPVH tras la administración de VSL#3 (dos sobres, dos veces al día) durante 8 semanas [226]. Independientemente de que debido al pequeño tamaño muestral no se puede excluir un error tipo II para el potencial beneficio de los probióticos sobre el GPVH, las características de los pacientes (cirrosis compensada o mínimamente descompensada, con puntuación media en la clasificación de Child-Pugh de 6, donde las alteraciones en la permeabilidad intestinal o el fenómeno de la traslocación bacteriana son menores) pueden ser causa de la ausencia de beneficio objetivada. Por ello el mismo grupo evalúa posteriormente, mediante un estudio controlado con grupo control y randomizado, el efecto de los probióticos sobre el GPVH en una población de 17 pacientes con cirrosis descompensada (Child Pugh grado B ó C) [227]. Al analizar los resultados, se objetiva en el grupo de administración de VSL#3 una reducción del GPVH similar a la obtenida en nuestro estudio [placebo: 2.8% (-11.8 a 8.8) vs. VSL#3: -11.6 (-20.2 a 5.4)]. Si bien este descenso en el GPVH tras la administración de VSL#3 no alcanza la significación estadística nuevamente un error tipo II (en relación con un pequeño tamaño muestral) puede ser responsable de la ausencia de resultados estadísticamente significativos. Si bien son dos estudios pequeños, los resultados de este trabajo original junto con los presentados por nuestro grupo sugieren un efecto beneficioso de los preparados probióticos sobre el GPVH.

Un último estudio, ya mencionado previamente, ha evaluado la utilidad de los probióticos asociados al tratamiento betabloqueante para obtener respuesta hemodinámica (disminución del GPVH $\geq 20\%$ respecto a valor basal o por debajo de 12 mmHg) [224]. En este estudio se evaluaron un total de 75 pacientes en tres grupos diferentes: un grupo recibió únicamente tratamiento

betabloqueante, un segundo grupo tratamiento betabloqueante + VSL#3, y un tercer grupo tratamiento betabloqueante + norfloxacino (8 semanas de tratamiento). Mientras que en el grupo tratado con propranolol se obtuvo respuesta hemodinámica en sólo el 27% de los pacientes (descenso medio del GPVH 11%), en el grupo tratado con betabloqueantes y VSL#3 se consiguió respuesta hemodinámica en el 60% de los pacientes (descenso medio del GPVH 19%), resultando esta diferencia estadísticamente significativa (en el grupo tratado con betabloqueantes y norfloxacino la respuesta hemodinámica se produjo en el 54% de los pacientes con un descenso medio del GPVH de 18%, sin existir diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo tratado con probióticos). Si bien el diseño del estudio y la utilización de otros fármacos con efecto sobre el GPVH impiden que pueda ser comparable al nuestro, estos resultados sugieren en cualquier caso un efecto beneficioso de VSL#3 sobre el GPVH por un mecanismo diferente al de los fármacos betabloqueantes.

Efecto de la administración de VSL#3 sobre parámetros hemodinámicos sistémicos

Otro hallazgo relevante de nuestro estudio que la administración de VSL#3 en los pacientes con cirrosis y ascitis mejoró el trastorno hemodinámico sistémico característico de la cirrosis descompensada. Tras la administración de VSL#3 durante 6 semanas, se objetivó un aumento en la presión arterial media (PAM) y la resistencia vascular sistémica (RVS), así como una reducción del índice cardíaco (IC) y de la frecuencia cardíaca (FC). Este hallazgo puede ser especialmente relevante porque, como se ha comentado, el estado de circulación hiperdinámica condiciona progresión y perpetuación del síndrome de hipertensión portal, con afectación secundaria de otros órganos; es por tanto responsable de graves complicaciones que aparecen en la evolución de la cirrosis hepática y que modifican de forma significativa la historia natural y el pronóstico de la misma (ascitis, síndrome hepatorenal, síndrome hepatopulmonar...)[228]. Por primera vez, un estudio ha valorado la influencia de la administración de un preparado probiótico sobre el síndrome de circulación hiperdinámica; si bien escasos estudios ya han evaluado el efecto de la

administración de VSL#3 sobre el GPVH [224, 226, 227], ninguno de ellos ha evaluado su efecto sobre parámetros hemodinámicos sistémicos.

Sin embargo, trabajos realizados para evaluar la influencia del norfloxacino sobre los parámetros hemodinámicos, a pesar de no mostrar un descenso significativo del GPVH, sí objetivaron una mejoría en la hemodinámica sistémica (aumento de RVS, aumento de PAM), en concordancia con los resultados de nuestro estudio [51, 153].

El aumento de la PAM y la RVS tras la administración de VSL#3, así como la disminución del IC y la FC, observados tras su administración durante 6 semanas, constituyen un efecto potencialmente beneficioso de los probióticos sobre los pacientes con cirrosis hepática descompensada, constituyendo un campo de interés para posteriores investigaciones.

Además en nuestro estudio se observó cómo, tras la administración de VSL#3 durante 6 semanas, se produce un aumento en los niveles de sodio sérico en los pacientes con hiponatremia, independiente de las cifras de creatinina y urea (sin modificación tras la administración del preparado probiótico). La hiponatremia es una alteración que refleja la disfunción circulatoria grave característica de los pacientes con cirrosis hepática avanzada [229]. Si bien el evento inicial y fundamental para el desarrollo del estado de circulación hiperdinámica es la vasodilatación arterial esplácnica y sistémica, se produce también un aumento del volumen plasmático que perpetúa el proceso. La vasodilatación arterial produce una situación de infrallenado vascular relativo que condiciona la activación de barorreceptores y receptores de volumen, del sistema nervioso simpático, del sistema renina-angiotensina-aldosterona y la secreción de vasopresina. Esta activación neurohormonal produce la retención de sodio y agua, produciendo expansión del volumen plasmático. Sin embargo, en los pacientes con cirrosis hepática avanzada y síndrome de hipertensión portal existe un deterioro en la excreción renal de agua libre, por lo que a pesar de la retención de sodio, en los estados más avanzados de la enfermedad con disfunción circulatoria grave, se produce una situación de hiponatremia (denominada hiponatremia hipervolémica o dilucional). En nuestro estudio la administración de VSL#3 mejoró, tal y como se ha detallado previamente, los

niveles sodio sérico en el 67% de los pacientes, consiguiendo incluso normalizar la cifra en dos casos con hiponatremia en el estudio basal.

La mejoría en los niveles de sodio sérico puede reflejar una mejoría de la disfunción circulatoria y una reducción de la hipervolemia como mecanismos fisiopatológicos que expliquen el beneficio de los probióticos en la cirrosis hepática. Si bien hasta ahora no se ha descrito modificación del sodio sérico en estudios realizados con VSL#3 sobre cirrosis hepática, sí se ha descrito una disminución en los niveles de aldosterona que podrían reflejar el mismo mecanismo fisiopatológico [226, 227].

Interesantemente, más allá de considerar la hiponatremia como un reflejo de la disfunción circulatoria, diversos estudios han vinculado dicha hiponatremia con complicaciones clínicas de la cirrosis hepática. Así, por una parte, se ha postulado la hipótesis de una posible influencia del edema cerebral inducido por la hiponatremia en la patogenia de la encefalopatía hepática [230]; además diversos estudios clínicos han asociado la hiponatremia como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de encefalopatía hepática [231]. Igualmente se ha descrito la hiponatremia como factor de riesgo independiente asociado al desarrollo de síndrome hepatorenal [232]. Por otra parte, la hiponatremia previa al trasplante hepático se ha asociado con un aumento de complicaciones neurológicas, renales e infecciosas en el postrasplante hepático, que condicionan incluso un aumento de la mortalidad [233, 234]. La implicación que la hiponatremia puede tener en distintas complicaciones de la cirrosis hepática descompensada ha llevado incluso a considerarla como un factor pronóstico independiente implicado en el riesgo de mortalidad [232, 235-237]. Por último, como dato no menos relevante respecto a la importancia de la hiponatremia en la cirrosis hepática descompensada, es de destacar un artículo donde se ha demostrado como la hiponatremia (sodio sérico 125-140 mmol/L) aumenta la mortalidad en los pacientes en lista de espera para trasplante hepático. Así, ajustado según puntuación del sistema MELD, el descenso de un punto en los niveles de sodio sérico aumenta el riesgo de mortalidad en lista de espera un 5% (HR 1.05; 95% CI, 1.03 - 1.08; P<0.001). Este mismo estudio demuestra igualmente como la adición del sodio al sistema de puntuación MELD mejora su

capacidad predictiva de mortalidad de los pacientes en lista de espera, así como su utilidad para la priorización de dichos pacientes en la misma [238].

Papel de los probióticos en la fisiopatología del síndrome de hipertensión portal y circulación hiperdinámica

Si bien el potencial papel beneficioso de los probióticos en la cirrosis hepática y el síndrome de hipertensión portal se basa en su capacidad para modular la flora bacteriana intestinal y mejorar la función de la barrera intestinal (influyendo así sobre el fenómeno de traslocación bacteriana), en nuestro estudio no hemos podido demostrar modificación del fenómeno de traslocación bacteriana ni del estado de inflamación crónica tras la administración de VSL#3. Por tanto, no se pueden justificar así los resultados obtenidos (no se ha evaluado modificación de la barrera mucosa intestinal inducida por la administración de VSL#3). Con base en los resultados disponibles en la literatura, donde la descontaminación intestinal conlleva una mejoría en los parámetros de circulación hiperdinámica [51, 153, 239, 240], se postuló un efecto similar de los probióticos como mecanismo para inducir cambios sobre los parámetros hemodinámicos sistémicos. Además, la presencia de DNA bacteriano en suero se ha asociado a un empeoramiento de la disfunción endotelial intrahepática [129], que podría justificar el efecto beneficioso de la administración de VSL#3 sobre el GPVH objetivado en nuestro estudio. Sin embargo, no hemos podido demostrar que la administración de VSL#3 durante 6 semanas atenúe el proceso de traslocación bacteriana. Tres de los 12 pacientes (25%) presentaban, en la muestra de sangre basal, DNA bacteriano en suero, una frecuencia similar a la descrita en estudios previos en pacientes con cirrosis descompensada y ascitis [123, 129]. La reducción del GPVH tras la administración de VSL#3 durante 6 semanas se confirmó en pacientes sin traslocación bacteriana detectable al inicio del estudio, bien por ausencia de DNA bacteriano en suero o por ausencia de cambios en los niveles séricos de LBP. Tampoco se objetivaron cambios en el metabolismo de óxido nítrico. Es posible que una única determinación de DNA bacteriano o LBP sérico no sea la forma apropiada de medir un fenómeno de carácter intermitente, como lo es el de la traslocación bacteriana.

Por último, tampoco pudimos confirmar modificación en los parámetros de respuesta inflamatoria sistémica, ya que la mayoría de los pacientes presentaban niveles indetectables o mínimamente elevados de citoquinas circulantes. Sólo se pudo observar una leve disminución, aunque estadísticamente no significativa, de IL-6 tras la administración de VSL#3.

Por otra parte, los estudios realizados en cirrosis experimental aportan igualmente resultados contradictorios. Varios estudios realizados sobre cirrosis experimental o hipertensión portal en ratas no han demostrado que la administración de preparados probióticos (que contienen únicamente *Lactobacillus*) por sí solos, prevengan la traslocación bacteriana (determinada mediante cultivos realizados en ganglios linfáticos mesentéricos) [208, 241, 242]. Sin embargo, otro estudio experimental (publicado únicamente en forma de *abstract*) realizado sobre ratas con cirrosis inducida demostró como en el grupo tratado con VSL#3 la incidencia de ascitis y traslocación bacteriana era menor, al igual que confirmó un descenso en los niveles séricos de TNF- α tras la administración del preparado probiótico [243]. La diferente composición de los preparados probióticos, tanto en el tipo de cepas incluidas como en la cantidad, puede ser la causa de la disparidad en los resultados obtenidos, como comentaremos posteriormente.

No hemos podido demostrar la existencia de un efecto de los probióticos sobre los mediadores de la inflamación crónica ni sobre el propio proceso de traslocación bacteriana. Aunque de un modo meramente especulativo, podemos sugerir diferentes causas para ello. En primer lugar, cabe la posibilidad de que no se haya utilizado la metodología más apropiada para demostrar su existencia. De hecho, algunos de los valores medidos se encontraban por debajo del límite de detección de la tecnología utilizada. En segundo lugar, pueden existir mecanismos de acción de los preparados probióticos no ligados a una modificación de la traslocación bacteriana; por ejemplo, la reducción en la concentración plasmática de antígenos como flagelina o peptidoglicano, o la estimulación de mediadores con efecto protector frente a la inflamación. De hecho, un reciente estudio ha demostrado como una única molécula microbiana (polisacárido A) producida por bacterias intestinales tiene un potente efecto inmunomodulador capaz de prevenir el desarrollo de enfermedad inflamatoria

intestinal a nivel experimental [244]. De igual forma, algunos estudios sugieren un efecto de los probióticos sobre la inmunidad sistémica (más que sobre el sistema inmune intestinal y la flora bacteriana intestinal) como mecanismo fisiopatológico que justificaría su efecto beneficioso en el organismo [245]. Por último, también se ha sugerido la existencia, en la cirrosis, de un estado de inflamación crónica sistémica no ligada a endotoxemia (en caso de infección por microorganismos gram positivos) [122].

No obstante, esta y otras posibilidades deben ser exploradas en futuros estudios.

Seguridad de la administración de VSL#3 en pacientes con cirrosis y ascitis

Sin duda, un aspecto relevante del presente estudio es la seguridad demostrada de la administración de VSL#3 en pacientes con cirrosis descompensada y ascitis, ya que no se han registrado efectos adversos importantes asociados a la administración de VSL#3. Como se ha comentado reiteradamente, la infección activa en el paciente con cirrosis descompensada puede ser responsable de la aparición de complicaciones y descompensaciones que conlleven un aumento significativo de la morbimortalidad. Si bien los preparados probióticos son bacterias vivas que, administradas en cantidades adecuadas, ofrecen efecto beneficioso en el organismo; es importante vigilar que su administración, sobre todo sobre pacientes con enfermedades graves e inmunodeficiencias (como son los pacientes con cirrosis descompensada), no sea una nueva fuente de infección. Casos aislados descritos en la literatura han relacionado la administración de probióticos con el desarrollo de sepsis, en pacientes con comorbilidades significativas [191, 246, 247]. Además, un estudio realizado en pacientes con pancreatitis aguda grave objetivó como la administración de preparados probióticos no sólo no disminuía la tasa de complicaciones infecciosas sino que aumentaba la mortalidad en el grupo de tratamiento [248]. Hasta ahora los estudios realizados con diferentes preparados probióticos en pacientes con enfermedades hepáticas no han registrado efectos adversos potencialmente graves. Igualmente, en los estudios realizados con VSL#3 sobre pacientes cirróticos tampoco se han descrito efectos

adversos importantes [224, 226, 227], si bien algunos son estudios realizados sobre cirrosis compensada o mínimamente descompensada. En nuestro estudio, realizado sobre pacientes con cirrosis descompensada (grado B o C de Child-Pugh, lo que confiere al paciente mayor grado de inmunosupresión y mayor riesgo de complicaciones), no se ha registrado infección bacteriana inducida por cepas pertenecientes a VSL#3. Por otra parte tampoco se ha objetivado en suero presencia de DNA bacteriano perteneciente a cepas incluidas en el preparado probiótico.

Únicamente un paciente refirió dispepsia leve en relación con la administración del preparado probiótico, efecto secundario que ya ha sido previamente descrito [249]. Dos pacientes finalizaron prematuramente el estudio por presentar dos complicaciones graves (hemorragia digestiva varicosa e infección grave con necesidad de ingreso hospitalario); no obstante, estas complicaciones no son infrecuentes en la evolución natural de la cirrosis hepática descompensada, considerando dichas complicaciones como eventos no relacionados con la administración de VSL#3.

Limitaciones del estudio

Si bien consideramos que los resultados obtenidos en nuestro estudio tienen relevancia clínica significativa, es indudable que existen algunas limitaciones que obligan a interpretar dichos resultados con cautela:

1. Pequeño tamaño muestral: aunque los estudios realizados por otros grupos para evaluar la eficacia de VSL#3 en el síndrome de hipertensión portal tampoco incluyen un número mucho mayor de pacientes (8 y 17) [226, 227], el diseño inicial del presente estudio estimó un tamaño muestral de 20 pacientes para poder obtener resultados significativos. Asumiendo un valor medio de GPVH basal de 20 mmHg (D.E. 4 mmHg, una muestra de 20 pacientes permitiría detectar con un α de 0.05 y un β de 0.8, cambios de 3 mmHg en el GPVH (15% de descenso), considerados clínicamente relevantes). Sin embargo, los estrictos criterios de inclusión y exclusión, al tratarse de pacientes con enfermedad hepática avanzada y ascitis, dificultaron el reclutamiento de paciente.

Igualmente, en la evaluación de pacientes candidatos a inclusión en el estudio se decidió excluir a aquellos con enfermedad hepática muy avanzada en cuyo caso era previsible la imposibilidad de cumplir el tiempo de estudio, bien por alta probabilidad de complicaciones con necesidad de ingreso y de requerir medidas consideradas como criterio de exclusión, o bien por prever tiempo en lista de espera de trasplante hepático inferior al necesario para completar el estudio. Además, si bien la realización de un estudio hemodinámico basal se indicó de forma rutinaria, al ser pacientes en evaluación para programa de trasplante hepático, la inclusión en el estudio implicaba la realización de un segundo estudio hemodinámico, lo que influyó en algunos pacientes candidatos al mismo a no aceptar la participación.

Sin embargo, a pesar del limitado número de pacientes, el estudio ha sido suficiente para demostrar una mejoría global significativa del GPVH tras la administración de VSL#3, con disminución del GPVH de 10.8% (más del 10% en el 68% de los pacientes), cercana al objetivo del 15% marcado en el diseño inicial del estudio. De igual forma, pese a este pequeño tamaño muestral hemos confirmado mejoría del estado de circulación hiperdinámica tras la administración de VSL#3 (aumento de la PAM y la RVS, así como la disminución del IC y la FC), de forma clínicamente relevante. Estos resultados, en nuestra opinión, fortalecen la hipótesis de la existencia de un efecto hemodinámico beneficioso inducido por la administración de VSL#3 sobre la cirrosis hepática descompensada y el síndrome de hipertensión portal. Así, pese a su limitación en el número de pacientes, consideramos que la muestra es suficiente para realizar una valoración suficiente de la hipótesis de trabajo.

2. Ausencia de grupo control: Una segunda limitación del presente trabajo es la ausencia de grupo control. El carácter invasivo del estudio hemodinámico (prueba necesaria para la determinación del GPVH), justificó la no inclusión de grupo control, al ser cuestionable desde el punto de vista ético su repetición en un grupo de pacientes a los que no se administraría el preparado probiótico. No obstante, y tal y como se ha especificado previamente, en una cohorte histórica de nuestro centro que incluye 30 pacientes con cirrosis compensada por hepatitis crónica C e hipertensión portal sometidos a dos estudios

hemodinámicos, una disminución espontánea del GPVH $\geq 10\%$ fue observada únicamente en dos de ellos (6.6%), lo que sugiere baja probabilidad de que un descenso espontáneo del GPVH sea responsable de los resultados obtenidos en nuestro estudio. Por otra parte, en los ensayos clínicos controlados con placebo destinados a evaluar el efecto sobre el gradiente porto-cava de los fármacos betabloqueantes no cardioselectivos, no se observaron reducciones significativas del GPVH en el grupo de pacientes aleatorizados a recibir placebo, tanto tras su administración aguda [250] como crónica [251, 252]. Por lo tanto, incluso en ausencia de un grupo control, parece razonable asumir que la mejoría observada en el GPVH traduce un efecto beneficioso de la administración de VSL#3 sobre el síndrome de hipertensión portal, y no se debe a una mejoría espontánea del mismo. Para reducir el riesgo de sesgos, se realizó una evaluación ciega de los trazados obtenidos durante los estudios hemodinámicos.

3. Determinación de mediadores vasoactivos: durante la realización del estudio no hemos tenido la posibilidad de realizar (por dificultad técnica) determinación de los niveles séricos de renina y aldosterona, sin poder evaluar de esta forma modificaciones significativas tras la administración de VSL#3. La presencia de cambios en los niveles de renina y aldosterona hubieran reforzado los resultados obtenidos en los parámetros hemodinámicos sistémicos, al ser reflejo de cambios en la expansión del volumen plasmático, uno de los mecanismos fisiopatológicos centrales en el desarrollo del síndrome de circulación hiperdinámica.

4. Elección del preparado probiótico, dosis y tiempo de administración. Otro posible punto controvertido del estudio es la elección del preparado probiótico, así como la pauta y el tiempo de administración de VSL#3:

- Respecto al preparado probiótico elegido para el estudio, se decidió la administración de VSL#3 al estar compuesto por 8 cepas de diferentes bacterias (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*); basándose en la posibilidad racional de que el uso combinado de diferentes cepas bacterianas pueda tener un efecto más marcado

que la administración de una cepa única, por un potencial efecto sinérgico o aditivo entre bacterias, tal y como se ha referido igualmente en otros estudios [163, 253, 254]. Además, en el momento del diseño del presente trabajo existía ya alguna información en la literatura sobre el uso de VSL#3 en pacientes con enfermedades hepáticas, sin efectos adversos asociados a la administración del mismo [255]. Sin embargo, la gran variedad de preparados probióticos y su heterogeneidad respecto a la composición (tanto en el tipo de cepas incluidas como en la cantidad de las mismas) y efectos demostrados en la literatura imposibilitan a día de hoy comparar los resultados entre diferentes probióticos y diferentes situaciones clínicas [163, 253, 254]. El beneficio obtenido en nuestro estudio con la administración de VSL#3 no se puede extrapolar, por tanto, a otros preparados probióticos. Parece recomendable realizar nuevos estudios comparando diferentes tipos de preparados probióticos en diferentes escenarios clínicos.

- Respecto a la cantidad de VSL#3 elegida para administrar durante el estudio, es preciso destacar inicialmente la ausencia de información que a día de hoy sigue existiendo sobre el régimen de administración y la dosis adecuada de los preparados probióticos. Los estudios clínicos realizados para comparar diferentes dosis de preparados probióticos son escasos, y además han utilizado para realizar dicha comparación la recuperación fecal de bacterias probióticas (mediante cultivos de heces) que pueden no reflejar la respuesta clínica. Además, el número de bacterias probióticas viables que llegan a colonizar el intestino no sólo depende de la cantidad administrada sino también de otros factores como el tipo de preparado probiótico, la administración con comida (que protege al preparado probiótico del ácido gástrico), o factores dependientes del propio individuo (como el pH intestinal, la motilidad intestinal, o la composición previa de la microbiota intestinal) [256]. Estudios previos han demostrado la modificación de la flora bacteriana intestinal inducida por la administración de VSL#3 (si bien a dosis superiores a nuestro estudio) [249, 257]. La cantidad de VSL#3

elegida para el presente estudio se estimó por la racionalidad de administrar una dosis mínima de preparados probióticos (≥ 106 UFC / gr de bacterias viables) que ha demostrado efecto beneficioso, teniendo en cuenta además que, pese a ser escasos, estudios previos con VSL#3 utilizando dosis superiores en pacientes cirróticos (1800 billones de bacterias al día) no habían demostrado efectos adversos [255]. Por otra parte, en ausencia de estudios de comparación de dosis, se decidió no aumentar la misma para mejorar así la adherencia al tratamiento. Estudios publicados con posterioridad al diseño del nuestro no han demostrado efecto beneficioso de VSL#3 sobre el GPVH pese a administrar el doble de dosis que nuestro estudio [227]. Por lo tanto, no podemos aventurar si la administración de mayor cantidad de VSL#3 en nuestro estudio podría haber ofrecido mejores resultados que los obtenidos.

- Respecto al tiempo de administración de VSL#3 hay que destacar que, al igual que ocurre con la cantidad elegida, no existe evidencia robusta en la literatura sobre el tiempo de administración de los preparados probióticos que inducen efecto beneficioso en el organismo. Por una parte, estudios clínicos previos realizados en pacientes cirróticos han confirmado como la administración de norfloxacino durante únicamente 4 semanas ha sido suficiente para objetivar una mejoría en los parámetros hemodinámicos sistémicos [152]. Por otra parte, aunque otros estudios han administrado VSL#3 a pacientes cirróticos durante 12 semanas con buena adherencia al mismo y ausencia de efectos adversos [255], las características basales de nuestra población de estudio (pacientes con cirrosis descompensada, ascitis, potenciales candidatos a trasplante hepático) hacía prever la posibilidad de descompensación o complicación a medio plazo, así como la posibilidad de trasplante hepático, que habría impedido completar el estudio y analizar así los resultados. Por este motivo se diseñó un tiempo de administración del preparado probiótico de seis semanas. Sin embargo, estudios publicados posteriormente al diseño del nuestro, realizado sobre pacientes con características basales similares a nuestra población

(cirrosis avanzada con clasificación Child-Pugh B ó C, MELD 18) han administrado VSL#3 durante 6 meses sin objetivar efectos adversos significativos y confirmando buena adherencia al mismo[205]. Por tanto, igual que ocurre con la dosis administrada de VSL#3, no podemos aventurar si la administración de VSL#3 durante un periodo más prolongado de tiempo podría haber aportado diferencias aún más relevantes en los resultados obtenidos.

5. Evaluación de la duración del efecto del preparado probiótico: Por último, en el presente estudio no hemos evaluado si el beneficio de la administración de VSL#3 objetivado sobre el GPVH y los parámetros hemodinámicos sistémicos (PAM, RVS, IC y FC) se mantiene en el tiempo tras finalizar la suplementación. En el estudio publicado en 2005 para evaluar el efecto de VSL#3 sobre los parámetros de función hepática en diferentes hepatopatías [255], además de confirmarse el efecto beneficioso se objetiva como éste se mantiene al menos 4 semanas después de finalizar la suplementación. En nuestro estudio, la evaluación de un efecto beneficioso de VSL#3 mantenido en el tiempo tras finalizar su suplementación hubiese obligado a la realización de un tercer estudio hemodinámico; esto, además de ser cuestionable desde el punto de vista ético, probablemente hubiese condicionado una menor participación en el mismo. Esta limitación han impedido evaluar, por tanto, un efecto beneficioso de VSL#3 mantenido en el tiempo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio permiten alcanzar las siguientes conclusiones:

1. La administración del preparado probiótico VSL#3 en pacientes con cirrosis hepática y ascitis parece disminuir el grado de hipertensión portal, estimado mediante el gradiente de presión venosa hepática, de forma clínicamente relevante.
2. El probiótico VSL#3 fue capaz de mejorar el estado de circulación hiperdinámica (expresado como aumento de la presión arterial media, aumento de las resistencias vasculares sistémicas y disminución del índice cardiaco).
3. Como reflejo de la mejoría en el estado de circulación hiperdinámica, se produjo un incremento significativo del sodio sérico, sin modificación en los parámetros de función renal.
4. No se observaron cambios en los parámetros de función hepática durante el curso el estudio.
5. La administración del probiótico VSL#3 en pacientes con cirrosis hepática y ascitis no se asoció a efectos adversos clínicamente relevantes.
6. Los resultados obtenidos suponen una base racional para el desarrollo de futuros estudios que permitan evaluar el beneficio de VSL#3 sobre variables clínicas en la cirrosis.

RESUMEN

RESUMEN

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN PREPARADO PROBIÓTICO SOBRE LAS ALTERACIONES HEMODINÁMICAS DE PACIENTES CON CIRROSIS Y ASCITIS.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo del síndrome de hipertensión portal en la historia natural de la cirrosis hepática es el principal determinante de la evolución de la enfermedad desde un estado de cirrosis compensada a un estado de cirrosis descompensada, siendo responsable de las complicaciones clínicas más importantes asociadas a la cirrosis: desarrollo de varices esófago-gástricas y hemorragia secundaria, ascitis, peritonitis bacteriana espontánea (PBE), encefalopatía hepática, síndrome hepatorenal, síndrome hepatopulmonar o hipertensión portopulmonar.

En la evolución del síndrome de hipertensión portal se desarrolla un síndrome de circulación hiperdinámica caracterizado por alteraciones a nivel de la hemodinámica sistémica (disminución de las resistencias vasculares sistémicas, hipotensión arterial y aumento del gasto cardiaco). Este síndrome de circulación hiperdinámica está implicado, igualmente, en algunas de las manifestaciones clínicas más importantes de la cirrosis descompensada, como la ascitis o el síndrome hepatorenal.

Tanto el síndrome de hipertensión portal como las alteraciones hemodinámicas sistémicas son fácilmente medibles y reproducibles mediante la realización de un estudio hemodinámico, método diagnóstico totalmente introducido en la práctica clínica habitual, que permite la medición tanto del gradiente de presión venosa hepática (GPVH, que refleja el incremento de presión portal) como de parámetros hemodinámicos sistémicos (resistencias vasculares sistémicas (RVS), gasto cardiaco (GC) y tensión arterial media (TAM)).

La traslocación bacteriana es un fenómeno fisiopatológico fundamental en el desarrollo de infecciones bacterianas en la cirrosis hepática. Además, la traslocación bacteriana (tanto de bacterias viables como de productos

bacterianos no viables) induce un estado de inflamación crónica que contribuye a empeorar el estado de circulación hiperdinámica y a perpetuar la traslocación bacteriana en los pacientes con cirrosis hepática. Los tres factores implicados en el desarrollo de traslocación bacteriana son el sobrecrecimiento bacteriano intestinal, el aumento de la permeabilidad intestinal y las alteraciones a nivel del sistema inmune. De estos tres factores, la modificación de la flora bacteriana intestinal y del sobrecrecimiento bacteriano es el factor más fácilmente modificable mediante una intervención farmacológica, siendo la descontaminación selectiva intestinal (mediante la administración de antibióticos como norfloxacino) tratamiento establecido en algunas de las complicaciones de la cirrosis hepática (profilaxis secundaria de peritonitis bacteriana espontánea, prevención de infección en episodio de hemorragia digestiva por varices esofágicas).

Los productos probióticos son preparados farmacológicos de microorganismos vivos que, administrados en la cantidad adecuada, proporcionan efectos beneficiosos en el individuo, mejorando las propiedades de su propia microflora bacteriana intestinal. Existe numerosa evidencia científica que confirma su utilidad en enfermedades gastrointestinales (diarrea aguda en la infancia, prevención de la diarrea asociada a antibióticos, enfermedad inflamatoria crónica intestinal...) sin efectos adversos significativos que limiten su uso.

En la cirrosis hepática descompensada, se ha estudiado la utilidad de los productos probióticos por el efecto que tienen sobre la flora bacteriana intestinal y la traslocación bacteriana. Si bien hasta ahora la evidencia disponible es escasa, existen estudios que han demostrado la utilidad de los productos probióticos en el manejo de la encefalopatía hepática, en la prevención de infecciones y en la mejoría de la función hepática. Escasos estudios han valorado la utilidad de los preparados probióticos en la modificación de la hipertensión portal (mediante valoración de cambios en el GPVH). No obstante, ningún estudio ha valorado por ahora la utilidad de los probióticos en la modificación del estado de circulación hiperdinámica (mediante la determinación de parámetros como la PAM, RVS, GC).

A día de hoy existe base racional suficiente para considerar que los probióticos, mediante la disminución del fenómeno de traslocación bacteriana,

son capaces de controlar el estado de inflamación crónica (disminuyendo los niveles circulantes de endotoxina, TNF alfa y productos derivados del óxido nítrico) y mejorar, por tanto, el incremento de la resistencia vascular intrahepática y el estado circulatorio hiperdinámico en los pacientes con cirrosis hepática avanzada.

HIPOTESIS

La administración del preparado probiótico VSL#3 en pacientes con cirrosis descompensada y ascitis podría mejorar el estado circulatorio hiperdinámico y el síndrome de hipertensión portal característico de estos pacientes.

OBJETIVOS

Objetivo principal

Evaluar de forma prospectiva la influencia de la administración de VSL#3 (durante 6 semanas) sobre el síndrome de hipertensión portal. Para ello se medirán los cambios en el gradiente de presión venosa hepático (GPVH), la presión arterial media (PAM), el gasto cardíaco (GC) y las resistencias vasculares sistémicas (RVS), tras la administración de VSL#3 durante 6 semanas.

Objetivos secundarios

Los objetivos secundarios evaluados en este estudio fueron los siguientes:

1. Cambios en los niveles séricos de mediadores vasoactivos: TNF α , productos derivados del ON (nitritos, nitratos, NOx), IL-1 β e IL-6.

2. Cambios en los parámetros de traslocación bacteriana: niveles séricos de LBP y presencia de DNA bacteriano en suero.
3. La evolución de los parámetros de función hepática: bilirrubina, albúmina, ALT, INR, sodio.
4. La seguridad de la administración de VSL#3 en pacientes con cirrosis descompensada y ascitis.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó el programa informático SPSS (versión 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU).

RESULTADOS

En el estudio se incluyeron un total de 17 pacientes (entre marzo del 2007 y mayo del 2011). De los 17 pacientes, 5 finalizaron prematuramente la toma de VSL#3: un paciente por hemorragia digestiva alta secundaria a varices esofágicas, un segundo paciente por un episodio de celulitis aguda en la pierna, un tercer paciente refirió dispepsia leve atribuida a la toma del preparado probiótico VSL#3. Por último, otros dos pacientes finalizaron el estudio al no aceptar un segundo estudio hemodinámico, retirando el consentimiento. La población final del estudio estuvo compuesta por 12 pacientes.

La administración del preparado probiótico VSL#3 mejora las alteraciones hemodinámicas hepáticas y sistémicas en pacientes con cirrosis y ascitis.

Tras la administración de VSL#3 durante 6 semanas se observó una disminución en el GPVH desde 21.8 ± 6.2 mmHg (valor medio basal) a 19.6 ± 6.2 mmHg al finalizar el estudio, lo que supone una reducción media del 10.8 (± 8.9)% ($P = 0.001$). 8 de los 12 pacientes (67%) consiguieron tras la suplementación con VSL#3 una disminución del GPVH superior al 10% respecto

al valor basal. En ningún paciente se observó aumento del GPVH en el estudio hemodinámico final.

De igual forma, tras la administración de VSL#3 durante 6 semanas se objetivó una reducción significativa en el índice cardíaco (desde 4.6 ± 1.6 a 4.2 ± 1.5 L/min/m² al finalizar el estudio, $P= 0.004$). Igualmente se comprobó una disminución de la frecuencia cardíaca, desde 83 ± 18 lpm a 75 ± 17 lpm al finalizar el estudio ($P= 0.001$), un aumento en la RVS desde 803 ± 272 a 912 ± 338 din x seg x cm⁻⁵ ($P= 0.016$), así como una tendencia al incremento de la PAM (82.9 ± 6.9 vs. 87.9 ± 10.1 mmHg, $P= 0.064$).

La suplementación con probiótico VSL#3 mejora los niveles de sodio sérico en pacientes con cirrosis y ascitis.

Tras la administración de VSL#3 se objetivó un aumento significativo en el nivel de sodio en suero, desde 135.1 ± 3.8 mEq/L (valor basal) a 138.0 ± 3.1 mEq/L al finalizar el estudio ($P = 0.009$), sin asociar cambios en los niveles de creatinina y urea ni modificaciones en la pauta de diuréticos que pudieran justificar el resultado obtenido. Ningún paciente con sodio sérico normal al inicio del estudio desarrolló hiponatremia durante el mismo.

La administración de VSL#3 en pacientes con cirrosis y ascitis no ocasionó cambios significativos en el fenómeno de traslocación bacteriana ni en los niveles de citoquinas circulantes o productos derivados del óxido nítrico.

En el estudio realizado no se ha podido demostrar influencia de la administración de VSL#3 sobre el fenómeno de traslocación bacteriana. Sólo 3 pacientes (25%) presentaron niveles detectables de DNA bacteriano en la muestra de sangre basal, con detección de un microorganismo diferente en cada uno de los tres pacientes (*Shigella flexneri*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*); tras la suplementación con VSL#3 durante 6 semanas, la detección de DNA bacteriano fue negativa en 2 de estos 3 pacientes, mientras que en el tercero continuó aislándose DNA bacteriano pero por un microorganismo diferente al objetivado en la muestra inicial. En el estudio tampoco se

objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles séricos de LBP al inicio del estudio y al final de suplementación con VSL#3.

Por otra parte, en el estudio realizado no se observaron cambios significativos en los niveles séricos de los parámetros de respuesta inflamatoria sistémica (IL-1 β , IL-6, TNF- α , productos derivados del óxido nítrico) tras la administración de VSL#3 durante 6 semanas.

La administración de VSL#3 es segura en pacientes con cirrosis y ascitis.

Durante el periodo de estudio y administración de VSL#3 no se observó en los pacientes ningún efecto adverso grave (sólo un paciente refiere dispepsia leve en relación con la toma del preparado probiótico) ni ninguna nueva descompensación de su enfermedad. Tampoco se observaron modificaciones en la puntuación de Child Pugh ni en la puntuación MELD. Un año después de la finalización del estudio 11 pacientes continuaban vivos (4 se habían sometido a un trasplante hepático, 7 mantenían estabilidad de la enfermedad hepática). Sólo un paciente falleció durante el primer año por enfermedad hepática avanzada (estando en lista de espera para trasplante hepático). En ningún paciente se aisló DNA bacteriano de cepas pertenecientes al preparado .

CONCLUSIONES

La administración del preparado probiótico VSL#3 en pacientes con cirrosis hepática y ascitis:

1. Disminuye el grado de hipertensión portal, estimado mediante el gradiente de presión venosa hepática, de forma clínicamente relevante.
2. Mejora de forma clínicamente relevante el estado de circulación hiperdinámica (expresado como aumento de la presión arterial media, aumento de las resistencias vasculares sistémicas, disminución del índice cardiaco, disminución de la frecuencia cardiaca).

3. Mejora, de forma paralela, los niveles de sodio sérico, como reflejo de la mejoría del estado de circulación hiperdinámica.
4. No se observaron cambios en los parámetros de función hepática durante la administración de VSL#3.
5. La suplementación es segura, sin asociar efectos adversos relevantes.
6. Se deben desarrollar futuros estudios para valorar el posible beneficio de VSL#3 sobre variables clínicas de la cirrosis.

SUMMARY

SUMMARY

EFFECT OF ADMINISTRATION OF A PROBIOTIC PREPARATION IN THE HEMODYNAMIC CHANGES OF PATIENTS WITH CIRRHOSIS AND ASCITES.

INTRODUCTION

The development of portal hypertension syndrome is the main determinant of the progression from a state of compensated cirrhosis to a state of decompensated cirrhosis, in the natural history of chronic liver disease. Portal hypertension is responsible for the major clinical complications associated with cirrhosis, namely, the development of gastroesophageal varices and secondary hemorrhage, ascites, spontaneous bacterial peritonitis (SBP), hepatic encephalopathy, hepatorenal syndrome, hepatopulmonary syndrome and portopulmonary hypertension.

The evolution of portal hypertension is frequently associated with the development of hyperdynamic circulation, which is characterized by systemic hemodynamic alterations that include decreases of blood pressure and systemic vascular resistance, and an increased of cardiac output. This hyperdynamic circulation further contributes to clinical manifestations of decompensated cirrhosis such as ascites or hepatorenal syndrome.

Both portal hypertension syndrome and the systemic hemodynamic alterations can be easily and reproducibly measured by performing a hepatic hemodynamic study, a diagnostic technique that can be fully incorporated into routine clinical practice. The hepatic hemodynamic study allows the measurement of hepatic venous pressure gradient (HVPG, an estimation of portal pressure) and of systemic hemodynamic parameters (systemic vascular resistance (SVR), cardiac output (CO) and mean arterial pressure (MAP)).

Bacterial translocation is a fundamental pathophysiological event for the development of bacterial infections in patients with liver cirrhosis. In addition, bacterial translocation (both viable bacteria and non-viable bacterial products) induces a state of chronic inflammation that contributes to the worsening of the hyperdynamic circulatory state and to the perpetuation of bacterial translocation in patients with liver cirrhosis. The three main factors involved in the

development of bacterial translocation in these patients are intestinal bacterial overgrowth, increased intestinal permeability and abnormalities in the immune system. Of these three factors, the changes in the intestinal microbiota and bacterial overgrowth are the easiest to modify by pharmacological intervention. Indeed, selective gut decontamination with antibiotics such as norfloxacin is an established treatment for some of the complications of liver cirrhosis, e.g. secondary prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis, prevention of infection during an episode of variceal bleeding, and others.

Probiotics are pharmacological preparations of living microorganisms that may provide beneficial effects to the individual when administered in adequate amounts, mainly by improving the properties of the individual's own intestinal bacterial microbiota. There is extensive scientific evidence confirming its usefulness in several gastrointestinal diseases, such as acute diarrhea in children, prevention of antibiotic-associated diarrhea, inflammatory bowel disease, and others, without significant side effects limiting their use.

The usefulness of probiotics in decompensated liver disease has been studied because of their potential effects on the intestinal bacterial microbiota and bacterial translocation. Although the available scientific evidence is weak so far, several studies support the utility of probiotics in the management of patients with hepatic encephalopathy, in whom they were associated with the prevention of infections and the improvement of liver function. Although some small studies have evaluated the usefulness of probiotics for the modification of portal hypertension or HVP, their potential effects on the systemic hyperdynamic circulation as assessed by the MAP, SVR, or CO, have never been evaluated.

Therefore, there is currently a sufficient rationale to suggest that probiotics may be able to modify the state of chronic inflammation in patients with advanced cirrhosis by reducing bacterial translocation and its associated phenomena (increased circulating levels of endotoxin, TNF alpha and nitric oxide products), thus improving the increased intrahepatic vascular resistance and the hyperdynamic circulatory state.

HYPOTHESIS

In patients with decompensated cirrhosis and ascites, the administration of the probiotic VSL#3 improves the hyperdynamic circulatory state and has beneficial effects on the syndrome of portal hypertension.

OBJECTIVES

Main goal

The general goal was to evaluate the influence of the administration of the probiotic VSL#3 preparation (two sachets per day for 6 weeks) on the syndrome of portal hypertension. By performing a hepatic hemodynamic study before and after VSL#3 supplementation, we specifically evaluated the potential effects of VSL#3 on the hepatic venous pressure gradient (HVPG), the mean arterial pressure (MAP), the cardiac output (CO) and the systemic vascular resistance (SVR).

Secondary objectives

Secondary aims of our study were to evaluate:

1. Changes in serum levels of vasoactive mediators: TNF α , NO end-products (nitrites, nitrates, NOx), IL-1 β and IL-6.
2. Changes in parameters of bacterial translocation: serum lipopolysaccharide binding protein (LBP) and presence of bacterial DNA in serum.
3. The evolution of liver function parameters in blood: bilirubin, albumin, ALT, INR, serum sodium.
4. The safety of VSL#3 administration in patients with decompensated cirrhosis and ascites.

STATISTICAL ANALYSIS

Calculations were performed using SPSS Statistical Package (version 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

A total of 17 patients were included in the study between March 2007 and May 2011. Five of them abandoned prematurely the study for the following reasons: one patient presented an episode of variceal bleeding, one patient presented an episode of acute cellulitis in the leg, and a third patient reported mild dyspepsia. Finally, two patients refused to undergo the second hepatic haemodynamic study and withdrew the consent. The final study population, therefore, comprised 12 patients.

Probiotic VSL#3 supplementation attenuated the hepatic and systemic haemodynamic alterations of patients with cirrhosis and ascites

The administration of VSL#3 was associated with a significant reduction of HVPG from 21.8 ± 6.2 mmHg at baseline to 19.6 ± 6.2 mmHg after 6 weeks of treatment, representing a mean decrease of $10.8 (\pm 8.9)\%$ ($P = 0.001$). Eight of the 12 patients (67%) achieved an haemodynamic response defined as a reduction in HVPG of at least 10% from baseline values. No patient showed an increase of HVPG from the initial to the final hemodynamic study.

The administration of VSL#3 also resulted in remarkable changes in systemic haemodynamic parameters. A significant reduction in cardiac index was observed following supplementation with VSL#3 for 6 weeks (from 4.6 ± 1.6 to 4.2 ± 1.5 L / min / m², $P = 0.004$). The reduction of cardiac index was accompanied by a decrease in heart rate from 83 ± 18 bpm to 75 ± 17 bpm ($P = 0.001$), an increase in SVR from 803 ± 272 to 912 ± 338 dyn x sec x cm⁻⁵ ($P = 0.016$) and a tendency to increase in MAP (82.9 ± 6.9 vs. 87.9 ± 10.1 mmHg, $P = 0.064$).

Probiotic VSL#3 supplementation improved serum sodium levels in patients with cirrhosis and ascites

An increase in serum sodium levels from 135.1 ± 3.8 mEq / L at baseline to 138.0 ± 3.1 mEq / L after 6 weeks of administration of VSL#3 ($P = 0.009$) was observed, and it was not accompanied by changes in serum creatinine or urea. No changes were made in the dose of diuretics that could justify the result. None of the patients with normal serum sodium at baseline developed hyponatremia after the study.

Probiotic VSL#3 supplementation was not accompanied by consistent changes in bacterial translocation, circulating cytokines or nitric oxide end products

Bacterial translocation was evaluated by the detection of circulating bacterial DNA and by the levels of LBP in plasma.

Only 3 patients (25%) presented detectable levels of bacterial DNA in blood at baseline. After supplementation with VSL#3 for 6 weeks, the detection of bacterial DNA was negative in 2 of the 3 patients, and remained positive in 1 patient, although for a different microorganism. No significant differences between serum levels of LBP at baseline and after VSL#3 supplementation were observed in the study.

Similarly, no significant changes were observed in mediators of the systemic inflammatory response (IL-1 β , IL-6, TNF- α , end-products of NO) after administration of VSL#3 for 6 weeks.

Probiotic VSL#3 supplementation was safe in patients with cirrhosis and ascites

No severe adverse events or decompensations of liver disease were observed in the 12 patients completing the 6 weeks of VSL#3 supplementation. Only one patient reported mild dyspepsia. Neither changes in the Child Pugh score nor in the MELD score were observed. Of the 12 patients that completed the study, 11 patients were alive one year after the study (four with successful liver transplantation) and 1 died during the first year due to advanced liver

disease while waiting for a liver transplantation. Bacterial DNA from the strains included in the probiotic preparation was not isolated in any patient.

CONCLUSIONS

The administration of the probiotic VSL#3 preparation in patients with liver cirrhosis and ascites:

1. Decreases the degree of portal hypertension estimated by the hepatic venous pressure gradient.
2. Ameliorates the hyperdynamic circulation syndrome, as assessed by the increase of mean arterial pressure and systemic vascular resistance, and by the decrease of heart rate.
3. Improves the serum sodium levels, probably paralleling and reflecting the improvement of the systemic hemodynamic disturbances.
4. There were no changes in liver function parameters during administration of VSL#3.
5. The administration of VSL#3 is safe and has no relevant adverse effects.
6. Future studies should be developed to assess the potential benefit of VSL#3 on clinical variables of cirrhosis.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Pinzani, M., M. Rosselli, and M. Zuckermann, *Liver cirrhosis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011. **25**(2): p. 281-90.
2. Anthony, P.P., et al., *The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization*. J Clin Pathol, 1978. **31**(5): p. 395-414.
3. Desmet, V.J. and T. Roskams, *Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth*. J Hepatol, 2004. **40**(5): p. 860-7.
4. Millward-Sadler GH, H.E., Wright R. , *Cirrhosis: an appraisal*. Liver and biliary disease. 2nd ed. , 1985: p. 821-860.
5. Rappaport, A.M., et al., *The scarring of the liver acini (Cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory considerations*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1983. **402**(2): p. 107-37.
6. Sherman, I.A., S.C. Pappas, and M.M. Fisher, *Hepatic microvascular changes associated with development of liver fibrosis and cirrhosis*. Am J Physiol, 1990. **258**(2 Pt 2): p. H460-5.
7. Abraldes, J.G., J.C. Garcia-Pagan, and J. Bosch, *[Functional component of portal hypertension]*. Gastroenterol Hepatol, 2004. **27**(6): p. 377-87.
8. Bosch, J. and J.C. Garcia-Pagan, *Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension*. J Hepatol, 2000. **32**(1 Suppl): p. 141-56.
9. Shibayama, Y. and K. Nakata, *Localization of increased hepatic vascular resistance in liver cirrhosis*. Hepatology, 1985. **5**(4): p. 643-8.
10. Wanless, I.R., et al., *Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension*. Hepatology, 1995. **21**(5): p. 1238-47.
11. Bhathal PS, G.H., *Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators*. J Hepatol., 1985. **1**: p. 325-337.
12. Zhang, J.X., W. Pegoli, Jr., and M.G. Clemens, *Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids*. Am J Physiol, 1994. **266**(4 Pt 1): p. G624-32.
13. Pinzani, M. and P. Gentilini, *Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis*. Semin Liver Dis, 1999. **19**(4): p. 397-410.
14. Kaneda, K., et al., *Endothelin-1-induced vasoconstriction causes a significant increase in portal pressure of rat liver: localized constrictive effect on the distal segment of preterminal portal venules as revealed by light and electron microscopy and serial reconstruction*. Hepatology, 1998. **27**(3): p. 735-47.

15. Shah, V., et al., *Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2923-30.
16. Gupta, T.K., et al., *Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats*. Hepatology, 1998. **28**(4): p. 926-31.
17. Rockey, D.C. and J.J. Chung, *Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension*. Gastroenterology, 1998. **114**(2): p. 344-51.
18. Bellis, L., et al., *Low doses of isosorbide mononitrate attenuate the postprandial increase in portal pressure in patients with cirrhosis*. Hepatology, 2003. **37**(2): p. 378-84.
19. Shah, V., et al., *Regulation of hepatic eNOS by caveolin and calmodulin after bile duct ligation in rats*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(6): p. G1209-16.
20. Van de Casteele, M., et al., *In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase decreases portal pressure in anaesthetised carbon tetrachloride cirrhotic rats*. Gut, 2002. **51**(3): p. 440-5.
21. Dudenhoefer, A.A., et al., *Bioactivation of nitroglycerin and vasomotor response to nitric oxide are impaired in cirrhotic rat livers*. Hepatology, 2002. **36**(2): p. 381-5.
22. Graupera, M., et al., *Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers*. Hepatology, 2003. **37**(1): p. 172-81.
23. Pinzani, M., et al., *Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells*. Gastroenterology, 1996. **110**(2): p. 534-48.
24. Bosch, J., et al., *Hepatic hemodynamics and the renin-angiotensin-aldosterone system in cirrhosis*. Gastroenterology, 1980. **78**(1): p. 92-9.
25. Loureiro-Silva, M.R., G.W. Cadelina, and R.J. Groszmann, *Deficit in nitric oxide production in cirrhotic rat livers is located in the sinusoidal and postsinusoidal areas*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **284**(4): p. G567-74.
26. Grossman, H.J., V.L. Grossman, and P.S. Bhathal, *Enhanced vasoconstrictor response of the isolated perfused cirrhotic rat liver to humoral vasoconstrictor substances found in portal venous blood*. J Gastroenterol Hepatol, 1992. **7**(3): p. 283-7.
27. Graupera, M., et al., *5-lipoxygenase inhibition reduces intrahepatic vascular resistance of cirrhotic rat livers: a possible role of cysteinyl-leukotrienes*. Gastroenterology, 2002. **122**(2): p. 387-93.
28. Moller, S., et al., *Endothelin-1 and endothelin-3 in cirrhosis: relations to systemic and splanchnic haemodynamics*. J Hepatol, 1995. **23**(2): p. 135-44.

29. Asbert, M., et al., *Circulating levels of endothelin in cirrhosis*. Gastroenterology, 1993. **104**(5): p. 1485-91.
30. Elliot, A.J., et al., *Endothelin-induced vasoconstriction in isolated perfused liver preparations from normal and cirrhotic rats*. J Gastroenterol Hepatol, 1997. **12**(4): p. 314-8.
31. Fernandez, M., et al., *Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats*. J Hepatol, 2005. **43**(1): p. 98-103.
32. Fernandez, M., et al., *Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice*. Gastroenterology, 2004. **126**(3): p. 886-94.
33. Chojkier, M. and R.J. Groszmann, *Measurement of portal-systemic shunting in the rat by using gamma-labeled microspheres*. Am J Physiol, 1981. **240**(5): p. G371-5.
34. Mosca, P., et al., *Pharmacology of portal-systemic collaterals in portal hypertensive rats: role of endothelium*. Am J Physiol, 1992. **263**(4 Pt 1): p. G544-50.
35. Chan, C.C., et al., *Effects of vasopressin on portal-systemic collaterals in portal hypertensive rats: role of nitric oxide and prostaglandin*. Hepatology, 1999. **30**(3): p. 630-5.
36. Chan, C.C., et al., *Endothelin-1 induces vasoconstriction on portal-systemic collaterals of portal hypertensive rats*. Hepatology, 2001. **33**(4): p. 816-20.
37. Huang, H.C., et al., *Effects of somatostatin and octreotide on portal-systemic collaterals in portal hypertensive rats*. J Hepatol, 2002. **36**(2): p. 163-8.
38. Kroeger, R.J. and R.J. Groszmann, *Increased portal venous resistance hinders portal pressure reduction during the administration of beta-adrenergic blocking agents in a portal hypertensive model*. Hepatology, 1985. **5**(1): p. 97-101.
39. Kowalski, H.J. and W.H. Abelman, *The cardiac output at rest in Laennec's cirrhosis*. J Clin Invest, 1953. **32**(10): p. 1025-33.
40. Schrier, R.W., et al., *Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis*. Hepatology, 1988. **8**(5): p. 1151-7.
41. Vallance, P. and S. Moncada, *Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide?* Lancet, 1991. **337**(8744): p. 776-8.
42. Battista, S., et al., *Hyperdynamic circulation in patients with cirrhosis: direct measurement of nitric oxide levels in hepatic and portal veins*. J Hepatol, 1997. **26**(1): p. 75-80.
43. Hori, N., R. Wiest, and R.J. Groszmann, *Enhanced release of nitric oxide in response to changes in flow and shear stress in the superior mesenteric arteries of portal hypertensive rats*. Hepatology, 1998. **28**(6): p. 1467-73.

44. Sieber, C.C. and R.J. Groszmann, *Nitric oxide mediates hyporeactivity to vasopressors in mesenteric vessels of portal hypertensive rats*. Gastroenterology, 1992. **103**(1): p. 235-9.
45. Pizcueta, M.P., et al., *Effects of inhibiting nitric oxide biosynthesis on the systemic and splanchnic circulation of rats with portal hypertension*. Br J Pharmacol, 1992. **105**(1): p. 184-90.
46. Pizcueta, P., et al., *Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition*. Gastroenterology, 1992. **103**(6): p. 1909-15.
47. Lee, F.Y., et al., *Administration of N omega-nitro-L-arginine ameliorates portal-systemic shunting in portal-hypertensive rats*. Gastroenterology, 1993. **105**(5): p. 1464-70.
48. Iwakiri, Y., et al., *Phosphorylation of eNOS initiates excessive NO production in early phases of portal hypertension*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(6): p. H2084-90.
49. Shah, V., et al., *Hsp90 regulation of endothelial nitric oxide synthase contributes to vascular control in portal hypertension*. Am J Physiol, 1999. **277**(2 Pt 1): p. G463-8.
50. Wiest, R., et al., *Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility*. J Clin Invest, 1999. **104**(9): p. 1223-33.
51. Albillos, A., et al., *Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement*. Hepatology, 2003. **37**(1): p. 208-17.
52. Bandi, J.C., et al., *Hyperkinetic circulation and decreased sensitivity to vasoconstrictors following portacaval shunt in the rat. Effects of chronic nitric oxide inhibition*. J Hepatol, 1999. **31**(4): p. 719-24.
53. La Villa, G., et al., *Hemodynamic, renal, and endocrine effects of acute inhibition of nitric oxide synthase in compensated cirrhosis*. Hepatology, 2001. **34**(1): p. 19-27.
54. Forrest, E.H., et al., *The effect of nitric oxide synthase inhibition on portal pressure and azygos blood flow in patients with cirrhosis*. J Hepatol, 1995. **23**(3): p. 254-8.
55. Sitzmann, J.V., et al., *Role of prostacyclin in the splanchnic hyperemia contributing to portal hypertension*. Ann Surg, 1989. **209**(3): p. 322-7.
56. Potenza, M.A., et al., *Endothelial COX-1 and -2 differentially affect reactivity of MVB in portal hypertensive rats*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(3): p. G587-94.
57. Guarner, C., et al., *Systemic prostacyclin in cirrhotic patients. Relationship with portal hypertension and changes after intestinal decontamination*. Gastroenterology, 1992. **102**(1): p. 303-9.
58. Bruix, J., et al., *Effects of prostaglandin inhibition on systemic and hepatic hemodynamics in patients with cirrhosis of the liver*. Gastroenterology, 1985. **88**(2): p. 430-5.

59. Benoit, J.N. and D.N. Granger, *Splanchnic hemodynamics in chronic portal hypertension*. Semin Liver Dis, 1986. **6**(4): p. 287-98.
60. Gomis, R., et al., *Impaired function of pancreatic islets from rats with portal hypertension resulting from cirrhosis and partial portal vein ligation*. Hepatology, 1994. **19**(5): p. 1257-61.
61. Kravetz, D., et al., *Effects of somatostatin on splanchnic hemodynamics and plasma glucagon in portal hypertensive rats*. Am J Physiol, 1988. **254**(3 Pt 1): p. G322-8.
62. Albillos, A., et al., *Octreotide prevents postprandial splanchnic hyperemia in patients with portal hypertension*. J Hepatol, 1994. **21**(1): p. 88-94.
63. Abraldes, J.G. and J. Bosch, *Somatostatin and analogues in portal hypertension*. Hepatology, 2002. **35**(6): p. 1305-12.
64. Groszmann, R.J., *Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences*. Hepatology, 1994. **20**(5): p. 1359-63.
65. Gines, P., P.Y. Martin, and M. Niederberger, *Prognostic significance of renal dysfunction in cirrhosis*. Kidney Int Suppl, 1997. **61**: p. S77-82.
66. Genecin, P., J. Polio, and R.J. Groszmann, *Na restriction blunts expansion of plasma volume and ameliorates hyperdynamic circulation in portal hypertension*. Am J Physiol, 1990. **259**(3 Pt 1): p. G498-503.
67. Garcia-Pagan, J.C., et al., *Effects of low-sodium diet and spironolactone on portal pressure in patients with compensated cirrhosis*. Hepatology, 1994. **19**(5): p. 1095-9.
68. Colombato, L.A., A. Albillos, and R.J. Groszmann, *The role of central blood volume in the development of sodium retention in portal hypertensive rats*. Gastroenterology, 1996. **110**(1): p. 193-8.
69. Groszmann, R.J., et al., *Wedged and free hepatic venous pressure measured with a balloon catheter*. Gastroenterology, 1979. **76**(2): p. 253-8.
70. Valla, D., et al., *Discrepancy between wedged hepatic venous pressure and portal venous pressure after acute propranolol administration in patients with alcoholic cirrhosis*. Gastroenterology, 1984. **86**(6): p. 1400-3.
71. Bosch, J., J.G. Abraldes, and R. Groszmann, *Current management of portal hypertension*. J Hepatol, 2003. **38 Suppl 1**: p. S54-68.
72. Steinlauf, A.F., et al., *Low-dose midazolam sedation: an option for patients undergoing serial hepatic venous pressure measurements*. Hepatology, 1999. **29**(4): p. 1070-3.
73. Garcia-Tsao, G., et al., *Portal pressure, presence of gastroesophageal varices and variceal bleeding*. Hepatology, 1985. **5**(3): p. 419-24.
74. Casado, M., et al., *Clinical events after transjugular intrahepatic portosystemic shunt: correlation with hemodynamic findings*. Gastroenterology, 1998. **114**(6): p. 1296-303.
75. Ratti, L., M. Pozzi, and J. Bosch, *Pathophysiology of portal hypertension in HCV-related cirrhosis. Putative role of assessment of portal pressure*

- gradient in Peginterferon-treated patients*. Dig Liver Dis, 2005. **37**(11): p. 886-93.
76. Ripoll, C., et al., *Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis*. Gastroenterology, 2007. **133**(2): p. 481-8.
 77. Rincon, D., et al., *Prognostic value of hepatic venous pressure gradient in patients with compensated chronic hepatitis C-related cirrhosis*. Scand J Gastroenterol, 2013. **48**(4): p. 487-95.
 78. Moitinho, E., et al., *Prognostic value of early measurements of portal pressure in acute variceal bleeding*. Gastroenterology, 1999. **117**(3): p. 626-31.
 79. Monescillo, A., et al., *Influence of portal hypertension and its early decompression by TIPS placement on the outcome of variceal bleeding*. Hepatology, 2004. **40**(4): p. 793-801.
 80. Rincon, D., et al., *Prognostic value of hepatic venous pressure gradient for in-hospital mortality of patients with severe acute alcoholic hepatitis*. Aliment Pharmacol Ther, 2007. **25**(7): p. 841-8.
 81. Bruix, J., et al., *Surgical resection of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: prognostic value of preoperative portal pressure*. Gastroenterology, 1996. **111**(4): p. 1018-22.
 82. Berzigotti, A., et al., *Portal hypertension and the outcome of surgery for hepatocellular carcinoma in compensated cirrhosis: a systematic review and meta-analysis*. Hepatology, 2015. **61**(2): p. 526-36.
 83. Feu, F., et al., *Relation between portal pressure response to pharmacotherapy and risk of recurrent variceal haemorrhage in patients with cirrhosis*. Lancet, 1995. **346**(8982): p. 1056-9.
 84. Escorsell, A., et al., *Predictive value of the variceal pressure response to continued pharmacological therapy in patients with cirrhosis and portal hypertension*. Hepatology, 2000. **31**(5): p. 1061-7.
 85. Merkel, C., et al., *The hemodynamic response to medical treatment of portal hypertension as a predictor of clinical effectiveness in the primary prophylaxis of variceal bleeding in cirrhosis*. Hepatology, 2000. **32**(5): p. 930-4.
 86. D'Amico, G., et al., *Hepatic vein pressure gradient reduction and prevention of variceal bleeding in cirrhosis: a systematic review*. Gastroenterology, 2006. **131**(5): p. 1611-24.
 87. Albillos, A., et al., *Value of the hepatic venous pressure gradient to monitor drug therapy for portal hypertension: a meta-analysis*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(5): p. 1116-26.
 88. Abraldes, J.G., et al., *Hemodynamic response to pharmacological treatment of portal hypertension and long-term prognosis of cirrhosis*. Hepatology, 2003. **37**(4): p. 902-8.

89. Ripoll, C., et al., *Influence of hepatic venous pressure gradient on the prediction of survival of patients with cirrhosis in the MELD Era*. Hepatology, 2005. **42**(4): p. 793-801.
90. Berg, R.D. and A.W. Garlington, *Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model*. Infect Immun, 1979. **23**(2): p. 403-11.
91. Wiest, R. and H.C. Rath, *Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2003. **17**(3): p. 397-425.
92. de Madaria, E., et al., *Detection and identification of bacterial DNA in serum from patients with acute pancreatitis*. Gut, 2005. **54**(9): p. 1293-7.
93. Cirera, I., et al., *Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis*. J Hepatol, 2001. **34**(1): p. 32-7.
94. Runyon, B.A., S. Squier, and M. Borzio, *Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis*. J Hepatol, 1994. **21**(5): p. 792-6.
95. Llovet, J.M., et al., *Translocated intestinal bacteria cause spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats: molecular epidemiologic evidence*. J Hepatol, 1998. **28**(2): p. 307-13.
96. Garcia-Tsao, G., et al., *Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites*. Gastroenterology, 1995. **108**(6): p. 1835-41.
97. Khoshini, R., et al., *A systematic review of diagnostic tests for small intestinal bacterial overgrowth*. Dig Dis Sci, 2008. **53**(6): p. 1443-54.
98. Perez-Paramo, M., et al., *Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites*. Hepatology, 2000. **31**(1): p. 43-8.
99. Guarner, C., et al., *Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites*. J Hepatol, 1997. **26**(6): p. 1372-8.
100. Casafont Morencos, F., et al., *Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis*. Dig Dis Sci, 1996. **41**(3): p. 552-6.
101. Chang, C.S., et al., *Small intestine dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis*. Hepatology, 1998. **28**(5): p. 1187-90.
102. Pardo, A., et al., *Effect of cisapride on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis*. Hepatology, 2000. **31**(4): p. 858-63.
103. Such, J., et al., *Ultrastructural characteristics of distal duodenum mucosa in patients with cirrhosis*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2002. **14**(4): p. 371-6.
104. Norman, D.A., et al., *Water and electrolyte movement and mucosal morphology in the jejunum of patients with portal hypertension*. Gastroenterology, 1980. **79**(4): p. 707-15.

105. Misra, V., et al., *Histomorphometric study of portal hypertensive enteropathy*. Am J Clin Pathol, 1997. **108**(6): p. 652-7.
106. Ramachandran, A., et al., *Intestinal mucosal alterations in experimental cirrhosis in the rat: role of oxygen free radicals*. Hepatology, 2002. **35**(3): p. 622-9.
107. Guarner, C., et al., *Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia*. Hepatology, 1993. **18**(5): p. 1139-43.
108. Tilg, H., et al., *Serum levels of cytokines in chronic liver diseases*. Gastroenterology, 1992. **103**(1): p. 264-74.
109. Pascual, S., et al., *Intestinal permeability is increased in patients with advanced cirrhosis*. Hepatogastroenterology, 2003. **50**(53): p. 1482-6.
110. Campillo, B., et al., *Intestinal permeability in liver cirrhosis: relationship with severe septic complications*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1999. **11**(7): p. 755-9.
111. Llovet, J.M., et al., *Selective intestinal decontamination with norfloxacin reduces bacterial translocation in ascitic cirrhotic rats exposed to hemorrhagic shock*. Hepatology, 1996. **23**(4): p. 781-7.
112. Sedman, P.C., et al., *The prevalence of gut translocation in humans*. Gastroenterology, 1994. **107**(3): p. 643-9.
113. Brooks, S.G., et al., *Translocation of enteric bacteria in humans*. Br J Surg, 1993. **80**(7): p. 901-2.
114. Wiest, R. and G. Garcia-Tsao, *Bacterial translocation (BT) in cirrhosis*. Hepatology, 2005. **41**(3): p. 422-33.
115. Garcia-Gonzalez, M., et al., *Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on leukocyte function in cirrhosis*. Gastroenterology, 1993. **105**(2): p. 527-31.
116. Rajkovic, I.A. and R. Williams, *Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis*. Hepatology, 1986. **6**(2): p. 252-62.
117. Such, J., et al., *Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis*. J Hepatol, 1988. **6**(1): p. 80-4.
118. Rimola, A., et al., *Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis*. Hepatology, 1984. **4**(1): p. 53-8.
119. Unno, N., et al., *Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats*. Gastroenterology, 1997. **113**(4): p. 1246-57.
120. Frances, R., et al., *Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF- α monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites*. J Hepatol, 2007. **46**(5): p. 797-803.
121. Albillos, A., A. de-la-Hera, and M. Alvarez-Mon, *Serum lipopolysaccharide-binding protein prediction of severe bacterial infection in cirrhotic patients with ascites*. Lancet, 2004. **363**(9421): p. 1608-10.

122. Gonzalez-Navajas, J.M., et al., *Presence of bacterial-DNA in cirrhosis identifies a subgroup of patients with marked inflammatory response not related to endotoxin*. J Hepatol, 2008. **48**(1): p. 61-7.
123. Such, J., et al., *Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites*. Hepatology, 2002. **36**(1): p. 135-41.
124. Frances, R., et al., *A sequential study of serum bacterial DNA in patients with advanced cirrhosis and ascites*. Hepatology, 2004. **39**(2): p. 484-91.
125. Guarner, C., et al., *The detection of bacterial DNA in blood of rats with CCl4-induced cirrhosis with ascites represents episodes of bacterial translocation*. Hepatology, 2006. **44**(3): p. 633-9.
126. Fernandez, J., et al., *Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis*. Hepatology, 2002. **35**(1): p. 140-8.
127. Borzio, M., et al., *Bacterial infection in patients with advanced cirrhosis: a multicentre prospective study*. Dig Liver Dis, 2001. **33**(1): p. 41-8.
128. Arvaniti, V., et al., *Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis*. Gastroenterology, 2010. **139**(4): p. 1246-56, 1256 e1-5.
129. Bellot, P., et al., *Bacterial DNA translocation is associated with systemic circulatory abnormalities and intrahepatic endothelial dysfunction in patients with cirrhosis*. Hepatology, 2010. **52**(6): p. 2044-52.
130. Angeli P, B.P., Cesari M et al. , *Prevalence of bacterial DNA in patients with cirrhosis and refractory ascites and its role in the development of cardiac and renal dysfunctions*. Hepatology, 2010. **54**(4): p. 342A.
131. Kalambokis, G.N., et al., *Rifaximin improves systemic hemodynamics and renal function in patients with alcohol-related cirrhosis and ascites*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2012. **10**(7): p. 815-8.
132. Fernandez, J., et al., *Primary prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis delays hepatorenal syndrome and improves survival in cirrhosis*. Gastroenterology, 2007. **133**(3): p. 818-24.
133. Baveja, R., et al., *LPS-induced imbalanced expression of hepatic vascular stress genes in cirrhosis: possible mechanism of increased susceptibility to endotoxemia*. Shock, 2002. **17**(4): p. 316-21.
134. Thalheimer, U., et al., *Infection, coagulation, and variceal bleeding in cirrhosis*. Gut, 2005. **54**(4): p. 556-63.
135. Vaquero, J., et al., *Infection and the progression of hepatic encephalopathy in acute liver failure*. Gastroenterology, 2003. **125**(3): p. 755-64.
136. Shawcross, D.L., et al., *Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis*. J Hepatol, 2004. **40**(2): p. 247-54.
137. Jun, D.W., et al., *Association between small intestinal bacterial overgrowth and peripheral bacterial DNA in cirrhotic patients*. Dig Dis Sci, 2010. **55**(5): p. 1465-71.

138. Gupta, A., et al., *Role of small intestinal bacterial overgrowth and delayed gastrointestinal transit time in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy*. J Hepatol, 2010. **53**(5): p. 849-55.
139. Sidhu, S.S., et al., *Rifaximin improves psychometric performance and health-related quality of life in patients with minimal hepatic encephalopathy (the RIME Trial)*. Am J Gastroenterol, 2011. **106**(2): p. 307-16.
140. Bajaj, J.S., et al., *Rifaximin improves driving simulator performance in a randomized trial of patients with minimal hepatic encephalopathy*. Gastroenterology, 2011. **140**(2): p. 478-487 e1.
141. Zapater, P., et al., *Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis*. Hepatology, 2008. **48**(6): p. 1924-31.
142. Bruns, T., et al., *Identification of bacterial DNA in neutrocytic and non-neutrocytic cirrhotic ascites by means of a multiplex polymerase chain reaction*. Liver Int, 2009. **29**(8): p. 1206-14.
143. Terg, R., et al., *Ciprofloxacin in primary prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a randomized, placebo-controlled study*. J Hepatol, 2008. **48**(5): p. 774-9.
144. Kalambokis, G.N. and E.V. Tsianos, *Rifaximin reduces endotoxemia and improves liver function and disease severity in patients with decompensated cirrhosis*. Hepatology, 2012. **55**(2): p. 655-6.
145. Kalambokis, G.N., et al., *Rifaximin improves thrombocytopenia in patients with alcoholic cirrhosis in association with reduction of endotoxaemia*. Liver Int, 2012. **32**(3): p. 467-75.
146. Gines, P., et al., *Norfloxacin prevents spontaneous bacterial peritonitis recurrence in cirrhosis: results of a double-blind, placebo-controlled trial*. Hepatology, 1990. **12**(4 Pt 1): p. 716-24.
147. Guarner, C., et al., *Effect of long-term trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis on ascites formation, bacterial translocation, spontaneous bacterial peritonitis, and survival in cirrhotic rats*. Dig Dis Sci, 1999. **44**(10): p. 1957-62.
148. Rabiller, A., et al., *Prevention of gram-negative translocation reduces the severity of hepatopulmonary syndrome*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(4): p. 514-7.
149. Runyon, B.A., et al., *Effect of selective bowel decontamination with norfloxacin on spontaneous bacterial peritonitis, translocation, and survival in an animal model of cirrhosis*. Hepatology, 1995. **21**(6): p. 1719-24.
150. Rimola, A., et al., *Oral, nonabsorbable antibiotics prevent infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage*. Hepatology, 1985. **5**(3): p. 463-7.
151. Soriano, G., et al., *Norfloxacin prevents bacterial infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage*. Gastroenterology, 1992. **103**(4): p. 1267-72.

152. Grange, J.D., et al., *Norfloxacin primary prophylaxis of bacterial infections in cirrhotic patients with ascites: a double-blind randomized trial*. J Hepatol, 1998. **29**(3): p. 430-6.
153. Rasaratnam, B., et al., *The effect of selective intestinal decontamination on the hyperdynamic circulatory state in cirrhosis. A randomized trial*. Ann Intern Med, 2003. **139**(3): p. 186-93.
154. Chin-Dusting, J.P., et al., *Effect of fluoroquinolone on the enhanced nitric oxide-induced peripheral vasodilation seen in cirrhosis*. Ann Intern Med, 1997. **127**(11): p. 985-8.
155. Novella, M., et al., *Continuous versus inpatient prophylaxis of the first episode of spontaneous bacterial peritonitis with norfloxacin*. Hepatology, 1997. **25**(3): p. 532-6.
156. Zhang, S.C., et al., *Effect of cisapride on intestinal bacterial and endotoxin translocation in cirrhosis*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(3): p. 534-8.
157. Madrid, A.M., et al., *Long-Term treatment with cisapride and antibiotics in liver cirrhosis: effect on small intestinal motility, bacterial overgrowth, and liver function*. Am J Gastroenterol, 2001. **96**(4): p. 1251-5.
158. Quigley, E.M., *Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota*. Pharmacol Res, 2010. **61**(3): p. 213-8.
159. Laparra, J.M. and Y. Sanz, *Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals*. Pharmacol Res, 2010. **61**(3): p. 219-25.
160. Stephen, A.M. and J.H. Cummings, *The microbial contribution to human faecal mass*. J Med Microbiol, 1980. **13**(1): p. 45-56.
161. Naidu, A.S., W.R. Bidlack, and R.A. Clemens, *Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB)*. Crit Rev Food Sci Nutr, 1999. **39**(1): p. 13-126.
162. Macpherson, A.J. and N.L. Harris, *Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 478-85.
163. Lata, J., et al., *Probiotics in hepatology*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(24): p. 2890-6.
164. Hanson, L.A., *Probiotics, other nutritional factors and intestinal microflora*. Philadelphia: Lippincot-Raven, 1999: p. 18-67.
165. Neish, A.S., *Microbes in gastrointestinal health and disease*. Gastroenterology, 2009. **136**(1): p. 65-80.
166. R, H., *Selection of strains for probiotic use*. Chapman and Hall, 1992: p. 209-224.
167. Y, R., *Probiotics and gastrointestinal disorders*. Am J Gastroenterol Suppl, 2012(1): p. 34-40.
168. Guandalini, S., et al., *Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2000. **30**(1): p. 54-60.

169. Guandalini, S., *Probiotics for children with diarrhea: an update*. J Clin Gastroenterol, 2008. **42 Suppl 2**: p. S53-7.
170. Shornikova, A.V., et al., *Lactobacillus reuteri as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1997. **24**(4): p. 399-404.
171. Guandalini, S., *Probiotics for prevention and treatment of diarrhea*. J Clin Gastroenterol, 2011. **45 Suppl**: p. S149-53.
172. Floch, M.H., et al., *Recommendations for probiotic use-2011 update*. J Clin Gastroenterol, 2011. **45 Suppl**: p. S168-71.
173. Szajewska, H., M. Ruszczynski, and A. Radzikowski, *Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials*. J Pediatr, 2006. **149**(3): p. 367-372.
174. Gao, X.W., et al., *Dose-response efficacy of a proprietary probiotic formula of Lactobacillus acidophilus CL1285 and Lactobacillus casei LBC80R for antibiotic-associated diarrhea and Clostridium difficile-associated diarrhea prophylaxis in adult patients*. Am J Gastroenterol, 2010. **105**(7): p. 1636-41.
175. Hickson, M., et al., *Use of probiotic Lactobacillus preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial*. BMJ, 2007. **335**(7610): p. 80.
176. Gionchetti, P., et al., *Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial*. Gastroenterology, 2000. **119**(2): p. 305-9.
177. Gionchetti, P., et al., *Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial*. Gastroenterology, 2003. **124**(5): p. 1202-9.
178. Mimura, T., et al., *Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis*. Gut, 2004. **53**(1): p. 108-14.
179. Kruis, W., et al., *Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine*. Gut, 2004. **53**(11): p. 1617-23.
180. Miele, E., et al., *Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis*. Am J Gastroenterol, 2009. **104**(2): p. 437-43.
181. Sood, A., et al., *The probiotic preparation, VSL#3 induces remission in patients with mild-to-moderately active ulcerative colitis*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2009. **7**(11): p. 1202-9, 1209 e1.
182. Tursi, A., et al., *Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL#3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study*. Am J Gastroenterol, 2010. **105**(10): p. 2218-27.
183. Deshpande, G., et al., *Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates*. Pediatrics, 2010. **125**(5): p. 921-30.

184. Awad, H., et al., *Comparison between killed and living probiotic usage versus placebo for the prevention of necrotizing enterocolitis and sepsis in neonates*. Pak J Biol Sci, 2010. **13**(6): p. 253-62.
185. Delia, P., et al., *Use of probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea*. Tumori, 2007. **93**(2): p. suppl 1-6.
186. Salminen, E., et al., *Preservation of intestinal integrity during radiotherapy using live Lactobacillus acidophilus cultures*. Clin Radiol, 1988. **39**(4): p. 435-7.
187. Shane, A.L., et al., *Guide to designing, conducting, publishing and communicating results of clinical studies involving probiotic applications in human participants*. Gut Microbes, 2010. **1**(4): p. 243-253.
188. Folster-Holst, R., *Probiotics in the treatment and prevention of atopic dermatitis*. Ann Nutr Metab, 2010. **57 Suppl**: p. 16-9.
189. Floch, M.H., *Recommendations for probiotic use in humans-a 2014 update*. Pharmaceuticals (Basel), 2014. **7**(10): p. 999-1007.
190. Snyderman, D.R., *The safety of probiotics*. Clin Infect Dis, 2008. **46 Suppl 2**: p. S104-11; discussion S144-51.
191. Hennequin, C., et al., *Possible role of catheters in Saccharomyces boulardii fungemia*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000. **19**(1): p. 16-20.
192. Munoz, P., et al., *Saccharomyces cerevisiae fungemia: an emerging infectious disease*. Clin Infect Dis, 2005. **40**(11): p. 1625-34.
193. Salminen, M.K., et al., *Lactobacillus bacteremia during a rapid increase in probiotic use of Lactobacillus rhamnosus GG in Finland*. Clin Infect Dis, 2002. **35**(10): p. 1155-60.
194. Albillos, A. and A. de la Hera, *Multifactorial gut barrier failure in cirrhosis and bacterial translocation: working out the role of probiotics and antioxidants*. J Hepatol, 2002. **37**(4): p. 523-6.
195. Medina, J., et al., *Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis*. Diabetes Care, 2004. **27**(8): p. 2057-66.
196. Li, Z., et al., *Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2003. **37**(2): p. 343-50.
197. Esposito, E., et al., *Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats*. J Nutr, 2009. **139**(5): p. 905-11.
198. Velayudham, A., et al., *VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice*. Hepatology, 2009. **49**(3): p. 989-97.
199. Loguercio, C., et al., *Long-term effects of Enterococcus faecium SF68 versus lactulose in the treatment of patients with cirrhosis and grade 1-2 hepatic encephalopathy*. J Hepatol, 1995. **23**(1): p. 39-46.
200. Jia, L. and M.H. Zhang, *Comparison of probiotics and lactulose in the treatment of minimal hepatic encephalopathy in rats*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(6): p. 908-11.

201. Liu, Q., et al., *Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis*. Hepatology, 2004. **39**(5): p. 1441-9.
202. Malaguarnera, M., et al., *Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharide (FOS) treatment in minimal hepatic encephalopathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study*. Dig Dis Sci, 2007. **52**(11): p. 3259-65.
203. Foster, K.J., S. Lin, and C.J. Turck, *Current and emerging strategies for treating hepatic encephalopathy*. Crit Care Nurs Clin North Am, 2010. **22**(3): p. 341-50.
204. Agrawal, A., et al., *Secondary prophylaxis of hepatic encephalopathy in cirrhosis: an open-label, randomized controlled trial of lactulose, probiotics, and no therapy*. Am J Gastroenterol, 2012. **107**(7): p. 1043-50.
205. Dhiman, R.K., et al., *Probiotic VSL#3 Reduces Liver Disease Severity and Hospitalization in Patients With Cirrhosis: A Randomized, Controlled Trial*. Gastroenterology, 2014. **147**(6): p. 1327-1337 e3.
206. Marotta, F., et al., *Experimental acute alcohol pancreatitis-related liver damage and endotoxemia: synbiotics but not metronidazole have a protective effect*. Chin J Dig Dis, 2005. **6**(4): p. 193-7.
207. Zareie, M., et al., *Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress*. Gut, 2006. **55**(11): p. 1553-60.
208. Bauer, T.M., et al., *Failure of Lactobacillus spp. to prevent bacterial translocation in a rat model of experimental cirrhosis*. J Hepatol, 2002. **36**(4): p. 501-6.
209. Ersoz, G., et al., *Intestinal permeability in liver cirrhosis*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1999. **11**(4): p. 409-12.
210. Lata, J., et al., *The effect of probiotics on gut flora, level of endotoxin and Child-Pugh score in cirrhotic patients: results of a double-blind randomized study*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2007. **19**(12): p. 1111-3.
211. Rayes, N., et al., *[Influence of probiotics and fibre on the incidence of bacterial infections following major abdominal surgery - results of a prospective trial]*. Z Gastroenterol, 2002. **40**(10): p. 869-76.
212. Rayes, N., et al., *Supply of pre- and probiotics reduces bacterial infection rates after liver transplantation--a randomized, double-blind trial*. Am J Transplant, 2005. **5**(1): p. 125-30.
213. Ewaschuk, J., et al., *Probiotic bacteria prevent hepatic damage and maintain colonic barrier function in a mouse model of sepsis*. Hepatology, 2007. **46**(3): p. 841-50.
214. Zhang, L., et al., *Lactobacillus rhamnosus GG decreases lipopolysaccharide-induced systemic inflammation in a gastrostomy-fed infant rat model*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2006. **42**(5): p. 545-52.
215. de Franchis, R. and V.F. Baveno, *Revising consensus in portal hypertension: report of the Baveno V consensus workshop on methodology*

- of diagnosis and therapy in portal hypertension.* J Hepatol, 2010. **53**(4): p. 762-8.
216. Swan, H.J., et al., *Catheterization of the heart in man with use of a flow-directed balloon-tipped catheter.* N Engl J Med, 1970. **283**(9): p. 447-51.
 217. Lebrec, D., et al., *The effect of propranolol on portal hypertension in patients with cirrhosis: a hemodynamic study.* Hepatology, 1982. **2**(5): p. 523-7.
 218. Armitage P, B.G., *Statistical methods in medical research.* . 3rd ed. Oxford, England: Blackwell Scientific, 1994.
 219. Groszmann, R.J., et al., *Beta-blockers to prevent gastroesophageal varices in patients with cirrhosis.* N Engl J Med, 2005. **353**(21): p. 2254-61.
 220. Abraldes, J.G., et al., *Simvastatin lowers portal pressure in patients with cirrhosis and portal hypertension: a randomized controlled trial.* Gastroenterology, 2009. **136**(5): p. 1651-8.
 221. Albillos, A., et al., *Propranolol plus prazosin compared with propranolol plus isosorbide-5-mononitrate in the treatment of portal hypertension.* Gastroenterology, 1998. **115**(1): p. 116-23.
 222. Gonzalez-Abraldes, J., et al., *Randomized comparison of long-term losartan versus propranolol in lowering portal pressure in cirrhosis.* Gastroenterology, 2001. **121**(2): p. 382-8.
 223. Andreu, V., et al., *Total effective vascular compliance in patients with cirrhosis. Effects of propranolol.* J Hepatol, 2002. **36**(3): p. 356-61.
 224. Gupta, N., et al., *Effects of the adjunctive probiotic VSL#3 on portal haemodynamics in patients with cirrhosis and large varices: a randomized trial.* Liver Int, 2013. **33**(8): p. 1148-57.
 225. Vlachogiannakos, J., et al., *Intestinal decontamination improves liver haemodynamics in patients with alcohol-related decompensated cirrhosis.* Aliment Pharmacol Ther, 2009. **29**(9): p. 992-9.
 226. Tandon, P., et al., *Effects of probiotic therapy on portal pressure in patients with cirrhosis: a pilot study.* Liver Int, 2009. **29**(7): p. 1110-5.
 227. Jayakumar, S., et al., *VSL#3 (R) probiotic therapy does not reduce portal pressures in patients with decompensated cirrhosis.* Liver Int, 2013. **33**(10): p. 1470-7.
 228. Iwakiri, Y. and R.J. Groszmann, *The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule.* Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S121-31.
 229. Gines, P. and M. Guevara, *Hyponatremia in cirrhosis: pathogenesis, clinical significance, and management.* Hepatology, 2008. **48**(3): p. 1002-10.
 230. Haussinger, D., *Low grade cerebral edema and the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis.* Hepatology, 2006. **43**(6): p. 1187-90.
 231. Jalan, R., et al., *Analysis of prognostic variables in the prediction of mortality, shunt failure, variceal rebleeding and encephalopathy following*

- the transjugular intrahepatic portosystemic stent-shunt for variceal haemorrhage*. J Hepatol, 1995. **23**(2): p. 123-8.
232. Gines, A., et al., *Incidence, predictive factors, and prognosis of the hepatorenal syndrome in cirrhosis with ascites*. Gastroenterology, 1993. **105**(1): p. 229-36.
 233. Londono, M.C., et al., *Hyponatremia impairs early posttransplantation outcome in patients with cirrhosis undergoing liver transplantation*. Gastroenterology, 2006. **130**(4): p. 1135-43.
 234. Dawwas, M.F., et al., *The impact of serum sodium concentration on mortality after liver transplantation: a cohort multicenter study*. Liver Transpl, 2007. **13**(8): p. 1115-24.
 235. Arroyo, V., et al., *Prognostic value of spontaneous hyponatremia in cirrhosis with ascites*. Am J Dig Dis, 1976. **21**(3): p. 249-56.
 236. Llach, J., et al., *Prognostic value of arterial pressure, endogenous vasoactive systems, and renal function in cirrhotic patients admitted to the hospital for the treatment of ascites*. Gastroenterology, 1988. **94**(2): p. 482-7.
 237. Fernandez-Esparrach, G., et al., *A prognostic model for predicting survival in cirrhosis with ascites*. J Hepatol, 2001. **34**(1): p. 46-52.
 238. Kim, W.R., et al., *Hyponatremia and mortality among patients on the liver-transplant waiting list*. N Engl J Med, 2008. **359**(10): p. 1018-26.
 239. Frances, R., et al., *Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis*. Hepatology, 2008. **47**(3): p. 978-85.
 240. Zapater, P., et al., *Norfloxacin modulates the inflammatory response and directly affects neutrophils in patients with decompensated cirrhosis*. Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1669-79 e1.
 241. Soriano, G., et al., *Lactobacillus johnsonii La1 without antioxidants does not decrease bacterial translocation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis*. J Hepatol, 2012. **57**(6): p. 1395-6.
 242. Wiest, R., et al., *Effect of Lactobacillus-fermented diets on bacterial translocation and intestinal flora in experimental prehepatic portal hypertension*. Dig Dis Sci, 2003. **48**(6): p. 1136-41.
 243. Sanchez E, B.A., Nieto JC, Vidal S, Mirelis B, Juárez J et al. , *VSL#3 probiotic treatment decreases bacterial translocation and proinflammatory state in rats with experimental cirrhosis*. J Hepatol, 2012. **56** (Suppl. 2): p. S268 (abstract).
 244. Mazmanian, S.K., J.L. Round, and D.L. Kasper, *A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease*. Nature, 2008. **453**(7195): p. 620-5.
 245. Fedorak, R.N. and K.L. Madsen, *Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders*. Curr Opin Gastroenterol, 2004. **20**(2): p. 146-55.

246. Cassone, M., et al., *Outbreak of Saccharomyces cerevisiae subtype boulardii fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(11): p. 5340-3.
247. Perapoch, J., et al., *Fungemia with Saccharomyces cerevisiae in two newborns, only one of whom had been treated with ultra-levura*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000. **19**(6): p. 468-70.
248. Besselink, M.G., et al., *Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet, 2008. **371**(9613): p. 651-9.
249. Bibiloni, R., et al., *VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis*. Am J Gastroenterol, 2005. **100**(7): p. 1539-46.
250. Banares, R., et al., *Carvedilol, a new nonselective beta-blocker with intrinsic anti-Alpha1-adrenergic activity, has a greater portal hypotensive effect than propranolol in patients with cirrhosis*. Hepatology, 1999. **30**(1): p. 79-83.
251. Groszmann, R.J., et al., *Hemodynamic events in a prospective randomized trial of propranolol versus placebo in the prevention of a first variceal hemorrhage*. Gastroenterology, 1990. **99**(5): p. 1401-7.
252. Feu, F., et al., *Double-blind investigation of the effects of propranolol and placebo on the pressure of esophageal varices in patients with portal hypertension*. Hepatology, 1991. **13**(5): p. 917-22.
253. Jonkers, D. and R. Stockbrugger, *Review article: Probiotics in gastrointestinal and liver diseases*. Aliment Pharmacol Ther, 2007. **26** **Suppl 2**: p. 133-48.
254. Sanders, M.E., et al., *An update on the use and investigation of probiotics in health and disease*. Gut, 2013. **62**(5): p. 787-96.
255. Loguercio, C., et al., *Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases*. J Clin Gastroenterol, 2005. **39**(6): p. 540-3.
256. McCartney, A.L., W. Wenzhi, and G.W. Tannock, *Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans*. Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(12): p. 4608-13.
257. Venturi, A., et al., *Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis*. Aliment Pharmacol Ther, 1999. **13**(8): p. 1103-8.

